

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Biología Celular



**TESIS DOCTORAL**

**Relevancia del microambiente medular en el desarrollo de la leucemia  
linfoblástica aguda infantil: papel del BMP4**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Ana Entrena Martínez**

Directores

**Ángeles Vicente López**

**Alberto Varas Fajardo**

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Medicina  
Departamento de Biología Celular**



**Relevancia del microambiente medular en el desarrollo de la  
leucemia linfoblástica aguda infantil: papel de BMP4**

***Ana Entrena Martínez***

**Dña. Ángeles Vicente López**, Catedrática de Universidad

Departamento de Biología Celular

Facultad de Medicina

Universidad Complutense

y

**D. Alberto Varas Fajardo**, Profesor Titular de Universidad

Departamento de Biología Celular

Facultad de Medicina

Universidad Complutense

Certifican que Dña. Ana Entrena Martínez, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, el trabajo titulado: “Relevancia del microambiente medular en el desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda infantil: papel de BMP4”, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas.

VºBº de los DIRECTORES

El interesado

Fdo. Ángeles Vicente López

Fdo. Alberto Varas Fajardo

Fdo. Ana Entrena Martínez



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**Facultad de Medicina  
Departamento de Biología Celular**



**Relevancia del microambiente medular en el desarrollo de la  
leucemia linfoblástica aguda infantil: papel de BMP4**

**TESIS DOCTORAL**

***Ana Entrena Martínez***

***2016***





*Cada uno seguimos un camino, cada uno vivimos nuestra propia aventura encontrándonos todo tipo de desafíos, y las decisiones que tomamos nos hacen ser lo que somos. Esas decisiones nos pondrán a prueba y nos llevarán al límite. Al final nos harán más fuertes de lo que nunca imaginamos.*

*Joseph Campbell*



Y parecía que nunca llegaría, pero sí. Aquí estamos poniendo punto final a una larga etapa que, a pesar de haber tenido sus momentos duros, puedo calificar sin lugar a dudas de positiva y constructiva. Momentos duros que se han salvado gracias a toda la gente que me ha acompañado y apoyado en este camino, a los que quiero dedicar unas palabras, que quizás se queden cortas, pero que por lo menos se quedan.

En primer lugar quiero dar las gracias de corazón a mis jefes, por todo su esfuerzo y dedicación durante estos años y, en especial, durante los últimos meses. Gracias por animarme cuando ya casi no quedaban fuerzas. Por hacerme crecer en lo profesional y en lo personal. Habéis conseguido crear un grupo que muy pocos tienen. Porque no somos solo compañeros de trabajo, somos una pequeña gran familia, y hemos tenido la suerte de poder formar parte de ella.

A Nines, gracias por haber ejercido no solo de jefa, sino en muchos casos de madre y psicóloga. Porque quién de nosotros no ha ido fardando de la jefa que tiene, y eso es gracias a toda la ayuda y esfuerzo dedicados. Por hacer que cada día crezcamos un poquito más en esto de la ciencia, por habernos apoyado en cualquier momento que lo hemos necesitado y por preocuparte para que todos estemos bien. Gracias por ese entusiasmo por la ciencia y por enseñarnos que, con dedicación, se puede conseguir todo.

A Alberto, gracias por la oportunidad que me diste de entrar en este mundillo y formar parte de esta gran familia. Por saber traer la calma en momentos de tempestad y por saber entender sin necesidad de hablar. Gracias por tu ayuda en nuestros primeros pasos en la docencia, ese “terrible” mundo que tanto me asustaba.

A Rosa, gracias por aportar siempre tu granito de arena. Gracias por el torbellino de ideas, porque tienes una mente privilegiada de la que todos siempre tenemos algo que aprender. Gracias por tu actitud ante todo y saber ver siempre el lado positivo de todo.

A toda la gente del labo, el resto de “la familia”. A Jaris, por todo lo que me enseñaste en mis primeros días aquí y por lo que aún me sigues enseñando. Gracias por estar dispuesta a ayudarnos en todo momento. A Victor y a Laura... ¡cómo se os echa de menos! Qué raro se hace estar en el laboratorio y que no andéis por allí cacharreando... Victor, ¿has visto hasta dónde he llegado? Y eso que no sabía ni hacer alícuotas... Gracias por la paciencia y la

ayuda. Porque incluso en esos momentos de máximo estrés tenías tiempo de resolver mil dudas. Me he trasladado a tu sitio a ver si se me pega algo de tus conocimientos, ya te contaré. Laura, gracias por toda la ayuda cuando empecé mi inmersión en el mundo NK. Por ser también un ejemplo de organización y por dejar en herencia esas maravillosas tablitas tan pequeñas que tanto gustan a los jefes. Espero que triunfeis en esta nueva etapa porque los dos valeis mucho. A Lidia, mi pupila, gracias por haber sido tan fácil enseñarte. Ahora te toca empezar a ti esta nueva etapa que yo acabo. Muchísima suerte, ya verás como todo sale bien... y que vivan los momentos pipeta! Al resto de la gente que estuvo en el labo. Noe (solete), Betty (como eche de menos tus cantares matutinos), Rodri (querido pupilo) y Fran (Chesco, fue cortito pero mereció la pena). Gracias porque todos habéis aportado algo a este trabajo. A la Sita, gracias por todos los conocimientos del mundo mesenquimal, por llevarme de la mano y enseñarme todo lo que se de él. A Eva, gracias por los consejos, las risas en el laboratorio y por estar siempre dispuesta a ayudar. Y a Alberto Fraile, por el entusiasmo y por ser otra mente privilegiada de la que tanto hay que aprender. No me olvido de Marga y Cati. Gracias por toda vuestra ayuda técnica para hacer que el laboratorio funcione y sin la que, en muchos casos, nos habríamos visto desbordados.

A toda la gente del CAI. Amalia, Juanjo, Alfonso y Luis, gracias por toda la ayuda. A Paula y a Miguel, ¡vamos que ya lo teneis hecho! Infinitas gracias a Carmen, por su ayuda y la paciencia que has tenido con todos nosotros cuando llegábamos con algún marrón. No me olvido tampoco de Esther, Tere y Cruz, aunque ya no estén por aquí, gracias por los buenos momentos. Gracias también a David, Javier y, especialmente a Agustín. Gracias por tu preocupación para que tengamos un huequito en este mundo de la ciencia.

A la gente del Niño Jesús. Manuel y Gustavo, gracias por todos los consejos y la ayuda en mis visitas "express".

Decir también que este trabajo no habría sido posible sin todas las personas que me rodea, que ha estado en los buenos y malos momentos y a los que puedo calificar de grandes amigos. Gracias de corazón a Edu y Pauli (Nala y Shira) por toda la confianza y abrirme las puertas de vuestra casa (literalmente, porque ahí comencé a escribir este trabajo). Edu, si te doy las gracias por todo lo que has hecho no acabaría nunca. Gracias por tu aportación a

la portada, me encanta. Gracias Pauli por tus consejos con las fichas bibliográficas y mucha suerte, que en pocos meses tenemos tu tesis en las manos.

A los cañeros perreros. Sara, Chesco (Fran, otra vez...), David (y el lanzallamas no fue necesario) y Laura. Y como no a Ita, Newton, Tavi (eh... Octavio) y Kira. Gracias por las risas, que no han sido pocas y que espero haya muchas más. Y siempre acompañadas de una buena cerveza.

A Kiko, tantos años de amistad. Gracias por ser mi conciencia y saber escuchar siempre en los momentos duros. Gracias por contagiar tu actitud ante la vida.

A Susana (Alai, Zen), que también has sufrido lo tuyo aguantándome. Gracias por los momentos de paréntesis filosofando acerca del mundo perruno. Y gracias por ayudarme a gestionar mi emoción.

Y por último agradecer todo el apoyo de mi familia. A mis padres que me dieron la oportunidad de estudiar y elegir lo que realmente quería hacer con mi vida. Gracias por estar siempre a mi lado y al de Mary, a pesar de los baches y los malos momentos. Porque desde pequeñas supisteis transmitirnos la idea de que todo se consigue. Da igual lo duro que sea y el esfuerzo que requiera, si con ellos conseguimos alcanzar nuestra meta. Este trabajo también es vuestro, porque soy lo que soy gracias a vosotros. Y si, gracias también por esas maravillosas indirectas en forma de libro que me decían que mis niveles de estrés estaban alcanzando su máximo.

Gracias Mary por estar desde pequeña pendiente de mí y por la enorme paciencia por aguantarme. Gracias por los libros, seguiremos pintando, y gracias porque esta portada también es tuya. Por saber unir exactamente lo que soy en ese símbolo que es la clave de la portada. Y gracias por la frase que aparece en esta tesis y que supe que debía aparecer aquí desde el primer momento que la leí.

Y, como no, quiero agradecer todo el apoyo de Adri (y de nuestros perrunos Pitu y Dina, que también han sufrido lo suyo a causa de mi estrés). Gracias por estar a mi lado en esta etapa, por toda la ayuda cuando estaba desbordada, por saber escuchar, por aguantar a esta cabezota y por tener la paciencia que yo muchas veces pierdo. Ahora comienza una

nueva etapa y no se qué nos deparará, pero espero que sea a tu lado y que podamos cumplir todos nuestros sueños. Porque si puedes soñarlo, puedes hacerlo. Te quiero.

Y nada más que decir. Gracias a todos por acompañarme en estos años y espero que podamos compartir muchos más.

Se os quiere,

Ana.

Y no podía faltar

“Dame una cita, vamos al parque...”

El presente trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos “*Relevancia funcional de diferentes poblaciones leucémicas de células NK humanas. Efectos antitumorales y papel de la vía de señalización BMP2/4*” (SAF2012-33180) e “*Implicación de la ruta de señalización BMP2/4 en la biología de las células NK humanas. BMPRIA como nuevo marcador de la diferenciación y funcionalidad de estas células*” (BFU2009-10315/BMC) y bajo el programa de Formación de Profesorado Universitario (AP2010-0795), Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.





## ABREVIATURAS

7AAD	<i>7-amino-actinomycin D</i>
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene</i>
ABTS	Ácido 2,2'-Azinobis – [3-etil-benzotiazolin-6] sulfónico
ActRI	Receptor tipo I de activina, del inglés <i>Activin receptor type I</i>
ActRII	Receptor tipo II de activina, del inglés <i>Activin receptor type II</i>
ADCC	Citotoxicidad dependiente de anticuerpo, del inglés <i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	<i>ADN complementario total</i>
AGM	<i>Región aorta-gónadas-mesonefros</i>
Akt	Proteína serín-treonín quinada RAC-alpha
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ALK	Receptor tipo I de Activina, del inglés <i>Activin receptor-like kinase</i>
ARN	Ácido ribonucleico
AR-Smad	Smad regulada por receptor específica de Activina, del inglés <i>Activin-specific receptor-regulated Smad</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BCR	<i>Breakpoint cluster region protein</i>
BMP	Proteína morfogenética ósea, del inglés <i>bone morphogenetic protein</i>
BMPRI	Receptor tipo I de BMP, del inglés <i>BMP receptor type I</i>
BMPRII	Receptor tipo II de BMP, del inglés <i>BMP receptor type II</i>
BrdU	5-bromo-2'-desoxiuridina
BRE	<i>Elemento de respuesta a BMP, del inglés BMP-responsive element</i>
BR-Smad	Smad regulada por receptor específica de BMP, del inglés <i>BMP-specific receptor-regulated Smad</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BTG1	<i>B-Cell Translocation Gene 1, Anti-Proliferative</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL	Quimioquina CC, del inglés <i>chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	Receptor de quimioquina CC, del inglés <i>chemokine (C-C motif) receptor</i>
CD3ζ	Cadena ζ del complejo CD3
CDK	Quinasa dependiente de ciclina, del inglés <i>cyclin-dependent kinase</i>
CFU-F	Unidades formadoras de colonias de fibroblastos, del inglés <i>colony-forming unit - fibroblast</i>
Col2.3	Gen promotor de colágeno 2.3
Co-Smad	Smad común, del inglés <i>common mediator Smad</i>
CSCs	Células madre tumorales, del inglés <i>cancer stem cells</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
CX3CR	Receptor de quimioquina CX3C, del inglés <i>chemokine (C-X3-C motif) receptor</i>
CXCL	Quimioquina CXC, del inglés <i>chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
CXCR	Receptor de quimioquinas CXC, del inglés <i>chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
DAP	<i>DNAX activation protein</i>
Dicer1	Ribonucleasa miembro de la familia de las RNasa III
DMH1	Homólogo 1 de dorsomorfina
EICH	Enfermedad injerto contra huesped
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMR	Enfermedad mínima residual
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>

ETV6/TEL	Ets Variant <i>Gene 6/TEL</i> Oncogene
FcRγ	<i>Fc receptor γ-chain</i>
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos, del inglés <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GDF	Factor de crecimiento y diferenciación, del inglés <i>growth/differentiation factor</i>
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, del inglés <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GNB2L1	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like-1</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos, del inglés
HLA	Antígenos leucocitarios humanos, del inglés <i>human leukocyte antigen</i>
HSCs	Células madre hematopoyéticas, del inglés <i>hematopoietic stem cell</i>
IBMX	<i>3-Isobutyl-1-methylxanthine</i>
IDO	Indol 2,3-dioxigenasa, del inglés <i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IFNγ	Interferon gamma
IGFBP2	<i>Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2</i>
IKZF1	<i>Ikaros family zinc finger 1</i>
IL	Interleuquina
ILCs	Células linfoides innatas, del inglés <i>innate lymphoid cells</i>
IP	Ioduro de propidio
IP10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular, del inglés <i>International Society of Cellular Therapy</i>
I-Smad	Smad inhibidora, del inglés <i>inhibitory Smad</i>
ITAM	Motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina del inglés, <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	Motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina, del inglés <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
JAK2	<i>Janus kinase 2</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KIR	Receptor tipo inmunoglobulina, del inglés <i>killer immunoglobulin-like receptor</i>
KRAS	<i>Kirsten RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homolog</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
LEPR	Receptor de leptina, del inglés <i>leptin receptor precursor</i>
LIF	Factor inhibidor de leucemia, del inglés <i>leukemia inhibitory factor</i>
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda tipo B
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda tipo T
LLC	Leucemia linfocítica crónica
LSCs	Células madre leucémicas, del inglés <i>leukemic stem cells</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno, del inglés <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos, del inglés <i>monocyte chemotactic protein</i>
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos, del inglés <i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIC	<i>MHC class I-chain related</i>
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos, del inglés <i>macrophage inflammatory protein</i>
miRNA	micro ARN

MLL	<i>Mixed lineage leukemia</i>
MMP	Metaloproteinasa de la matriz extracelular, del inglés <i>matrix metalloproteinases</i>
MO-HSCs	Células madre hematopoyéticas aisladas de médula ósea
MSC-DS	Células madre mesenquimales aisladas de donantes sanos
MSC-FT	Células madre mesenquimales aisladas de pacientes con LLA ya recuperados, un año fuera de tratamiento.
MSC-LLA	Células madre mesenquimales aisladas de pacientes pediátricos diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda con riesgo bajo o intermedio de recaída
MSC-LLA+15	Células madre mesenquimales aisladas de pacientes pediátricos diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda a los 15 días de iniciarse el tratamiento quimioterápico.
MSC-LLA+35	Células madre mesenquimales aisladas de pacientes pediátricos diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda a los 35 días de iniciarse el tratamiento quimioterápico.
MSC-LLA-RA	Células madre mesenquimales aisladas de pacientes pediátricos diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda con riesgo alto de recaída
MSCs	Células madre mesenquimales, del inglés <i>mesenchymal stromal cells</i>
NCRs	Receptores de citotoxicidad natural, del inglés <i>natural cytotoxicity receptors</i>
NF-κB	Factor nuclear kappa B, del inglés <i>nuclear factor NF-kappa-B</i>
NG2	<i>Neural/glial antigen 2</i>
NK	Célula asesina natural, del inglés <i>natural killer cell</i>
NR3C1	<i>Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homolog</i>
OP	Proteína osteogénica, del inglés <i>osteogenic protein</i>
ORO	<i>Oil O Red</i>
PAX5	<i>Paired Box 5</i>
PBMCs	Célula mononuclear de sangre periférica, del inglés <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate buffered saline</i>
PBX1	<i>Pre-B-cell leukemia transcription factor 1</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	Proteína de muerte celular programada 1, del inglés <i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L	Ligando de muerte celular programada, del inglés <i>programmed death-ligand</i>
PETHEMA	Protocolo Español para Hemopatías Malignas
PGE2	Prostaglandina E2, del inglés <i>prostaglandin E2</i>
PI3K	Fosfoinositida-3-quinasa, del inglés <i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PLCy2	<i>Phospholipase Cy2</i>
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
RANTES	<i>Regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>
RETI-SEHOP	Registro Español de Tumores Infantiles – Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica.
RUNX1/AML1	<i>Runt-related transcription factor 1/acute myeloid leukemia 1</i>
Sca-1	<i>Stem cells antigen-1</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SLP76	<i>76 kDa tyrosine phosphoprotein</i>
Syk	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>

TAB1	<i>TAK1-binding protein 1</i>
TAK1	<i>TGF-beta-activated kinase 1</i>
TCF3/E2A	<i>Transcription Factor 3 /E2A Immunoglobulin Enhancer Binding Factors E12/E47</i>
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta, del inglés <i>transforming growth factor beta</i>
TLR	Receptor tipo toll, del inglés <i>toll-like receptor</i>
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés <i>tumor necrosis factor alfa</i>
TP53	<i>Cellular tumor antigen p53</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
T $\beta$ RI	Receptor tipo I de TGF- $\beta$ , del inglés <i>TGF-<math>\beta</math> type I receptor</i>
ULPB	Proteína de unión a UL16, del inglés <i>UL16-binding protein</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés <i>vascular endothelial growth factor</i>
XCL	Quimioquina C, del inglés, <i>chemokine (C motif) ligand</i>
ZAP70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

## ÍNDICE



<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y MÉTODOS	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
CONCLUSIONES	12
INTRODUCTION	14
OBJECTIVE	15
MATERIALS AND METHODS	16
RESULTS AND DISCUSION	16
CONCLUSIONS	18
REFERENCES	20
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
<b>1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA</b>	<b>25</b>
1.1. Características generales	25
1.2. Fisiopatología de la enfermedad	26
1.3. Clínica, diagnóstico y estratificación de los pacientes: grupos de riesgo	27
1.4. Recaída en la enfermedad	30
1.5. Tratamiento de la enfermedad	30
<b>2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES: UN COMPONENTE FUNDAMENTAL DEL NICHOS HEMATOPOYÉTICO</b>	<b>32</b>
2.1. Características del nicho hematopoyético	32
2.2. Características de las células madre mesenquimales	35
2.3. Función inmunomoduladora de las células madre mesenquimales	36
2.4. Células madre mesenquimales en terapia celular	39
2.5. Células madre mesenquimales en las enfermedades hematológicas	40
<b>3. CÉLULAS NK</b>	<b>43</b>
3.1. Características de las células NK	43
3.2. Células NK en el contexto tumoral	46
3.3. Función inmunomoduladora de las MSCs sobre la población de células NK	49
<b>4. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS</b>	<b>51</b>



4.1.	Componentes de la vía de señalización BMP. ....	52
4.2.	Regulación de la vía de señalización BMP. ....	55
4.3.	Función de las proteínas morfogenéticas óseas. ....	57
4.4.	Proteínas morfogenéticas óseas en el contexto tumoral. ....	59
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>		<b>63</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>		<b>67</b>
1.	Muestras de pacientes.....	69
3.	Ensayos de diferenciación de las células madre mesenquimales. ....	71
4.	Obtención y cultivo de células leucémicas. ....	72
5.	Aislamiento de células NK de sangre periférica. ....	73
6.	Establecimiento de los cocultivos celulares. ....	74
6.1.	Cocultivos MSCs: células NK. ....	74
6.2.	Cocultivos células NK: células leucémicas. ....	74
6.3.	Cocultivos MSCs: células leucémicas. ....	75
7.	Ensayos de citotoxicidad.....	75
8.	Determinación de la capacidad proliferativa. ....	76
9.	Determinación de la viabilidad de las distintas poblaciones celulares. ....	76
10.	Citometría de flujo. ....	77
11.	Análisis por PCR cuantitativa. ....	79
12.	Determinación de factores solubles en los sobrenadantes. ....	80
13.	Análisis estadístico. ....	80
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>81</b>
1.	<b>CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE RIESGO BAJO/INTERMEDIO PROMUEVEN LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LAS CÉLULAS NK .....</b>	<b>83</b>
1.1.	Las MSCs derivadas de pacientes pediátricos con LLA incrementan la capacidad citolítica de las células NK. ....	84
1.2.	Las MSCs de pacientes con LLA no inhiben la regulación positiva de moléculas activadoras en las células NK. ....	87
1.3.	Las células NK cultivadas con MSCs de pacientes con LLA expresan mayores niveles de granzima y perforina. ....	88

1.4.	La viabilidad de las células NK no se ve modificada tras cultivo con las MSCs procedentes de donantes sanos ni de pacientes con LLA. ....	89
1.5.	Las MSCs aisladas de pacientes en tratamiento quimioterápico recuperan las propiedades inmunomoduladoras características de las MSCs de donantes sanos. .	90
1.6.	Las MSCs de donantes sanos y de pacientes pediátricos con LLA presentan la misma susceptibilidad a la lisis mediada por las células NK. ....	92
2.	LAS MSCs RESPONDEN A LA PRESENCIA DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS MODIFICANDO SUS PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS.....	94
2.1.	Las MSCs derivadas de donantes sanos adoptan características inmunomoduladoras de MSCs de pacientes con LLA cuando se exponen a células leucémicas. ....	94
3.	ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN EL CAMBIO DE LAS PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LAS MSCs. ....	96
3.1.	Las MSCs de los pacientes con LLA reducen la producción de TGF- $\beta$ en relación a las MSCs de donantes sanos. ....	96
3.2.	Análisis comparado de la producción de diferentes citoquinas y quimioquinas por las MSCs de pacientes con LLA y donantes sanos. ....	97
3.3.	Las MSCs de los pacientes con LLA presentan una incrementada expresión de las moléculas CD40 y CD86, y reducen la de PD-L1 y PD-L2. ....	99
3.4.	La expresión del receptor tipo Toll TLR4 y del ligando Jagged1 se encuentra incrementada en las MSCs de los pacientes con LLA. ....	100
4.	CONTRIBUCIÓN DE BMP4 A LA FUNCIÓN INMUNOMODULADORA DE LAS MSCs. ...	103
4.1.	Las MSCs de donantes sanos y de pacientes con LLA expresan todos los componentes de la vía de señalización BMP2/4. ....	103
4.2.	Producción incrementada de BMP4 por las MSCs aisladas de pacientes con LLA. ....	104
4.3.	La señalización BMP2/4 como mediador en la función inmunomoduladora de las MSCs.....	105
5.	PAPEL DE BMP4 EN LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS Y RELEVANCIA EN EL CONTROL DE LA EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO. ....	108
5.1.	Las líneas leucémicas TOM1 y NALM6 expresan los componentes de la vía de señalización BMP2/4. ....	108
5.2.	Niveles incrementados de BMP4 provocan una disminución de la proliferación de las células de la línea leucémica de bajo riesgo, NALM6. ....	109

5.3. BMP4 incrementa la susceptibilidad de las células leucémicas a la lisis mediada por las células NK. ....	112
6. EXPRESIÓN DE LIGANDOS PARA LOS RECEPTORES DE LAS CÉLULAS NK EN MUESTRAS PRIMARIAS DE LLA. RELEVANCIA DE LA EXPRESIÓN DE B7H6 EN EL CONTEXTO DE LA RECAÍDA LEUCÉMICA. ....	115
6.1. Análisis de la expresión de ligandos para los receptores de las células NK en muestras primarias de LLA. ....	115
6.2. La expresión del ligando B7H6 se encuentra reducida en pacientes con LLA-B catalogados de riesgo bajo/intermedio que recaen en la enfermedad. ....	116
7. CAMBIOS FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES DE LAS CÉLULAS NK TRAS INTERACCIÓN CON LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS. ....	118
7.1. Perfil fenotípico de las células NK presentes en la médula ósea de los pacientes con LLA. ....	118
7.2. Las células NK modifican su patrón de expresión de receptores tras contacto con las células leucémicas. ....	119
7.3. La presencia de la línea leucémica NALM6 reduce la expresión del receptor BMPRIA en las células NK. ....	122
7.4. Los cambios fenotípicos en las células NK producidos como consecuencia del contacto con las células leucémicas provocan una reducción en la capacidad funcional de las primeras. ....	122
DISCUSIÓN .....	125
CONCLUSIONES .....	147
BIBLIOGRAFÍA .....	151
ANEXO I.....	181
ANEXO II .....	193

**RESUMEN**



## RELEVANCIA DEL MICROAMBIENTE MEDULAR EN EL DESARROLLO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA INFANTIL: PAPEL DE BMP4

### INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es una enfermedad hematológica muy frecuente en edad infantil, que se origina por diversas alteraciones genéticas que alteran la capacidad de proliferación y diferenciación de los progenitores linfoides, contribuyendo a su acumulación en médula ósea. La clasificación de los pacientes en el momento del diagnóstico en diferentes grupos de riesgo de recaída ha permitido aumentar la tasa de supervivencia hasta un 90%; sin embargo, un 10-15% de ellos sigue recayendo en la enfermedad, lo que hace necesario el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento <sup>1</sup>. En este sentido, en los últimos años, además del estudio de las características de las células leucémicas, numerosos trabajos han centrado su interés en conocer las características del microambiente donde estas se asientan. En concreto, los estudios en la población de células madre mesenquimales (MSCs) en pacientes con enfermedades hematológicas han revelado alteraciones en su capacidad de proliferación, diferenciación y producción de citoquinas <sup>2-6</sup>. Sin embargo, su función inmunosupresora, principal característica de estas células, apenas ha sido estudiada y en los escasos trabajos en que se ha analizado, los cambios observados han sido atribuidos a alteraciones dirigidas por las células tumorales para favorecer la progresión de la enfermedad <sup>5-7</sup>. Asimismo, nuevos estudios muestran un comportamiento diferencial de las MSCs de los pacientes dependiente del riesgo de recaída que podría ser determinante en el pronóstico de la enfermedad <sup>8</sup>.

Las células NK son una población linfoide con capacidad para reconocer células tumorales o infectadas de manera directa y eliminarlas gracias a su maquinaria lítica. Producen además citoquinas y quimioquinas, promoviendo la activación de células de la inmunidad adaptativa <sup>9</sup>. Estas propiedades han hecho que sean consideradas los principales agentes antitumorales del organismo. Sin embargo, en muchos tumores se ha descrito una capacidad funcional comprometida de las mismas haciéndolas incapaces de hacer frente a la transformación maligna <sup>10-12</sup>. Así, las células tumorales han desarrollado diferentes estrategias para limitar la acción del sistema inmunitario que incluyen la producción de

factores inmunosupresores o la liberación al medio de los ligandos para los receptores de activación de las células NK <sup>13</sup>.

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son una familia de factores de crecimiento perteneciente a la superfamilia de TGF- $\beta$ , originalmente descubiertas por su capacidad para inducir la formación de hueso y cartílago pero que actualmente se sabe desempeñan múltiples funciones. Estas proteínas se secretan en forma de dímeros e interaccionan con diferente afinidad con complejos receptor heterotetraméricos formados por dos receptores tipo I (BMPRIA, BMPRIB, ActRIA) y dos receptores tipo II (BMPRII, ActRIIA, ActRIIB). Una vez unido el ligando al complejo receptor, los receptores tipo II con actividad quinasa constitutiva transfosforilan a los receptores tipo I, que a su vez fosforilan a las proteínas Smads reguladas por receptor (BR-Smad). Estas se unen a la proteína mediadora común Smad4 y forman un complejo que se transloca al núcleo donde regula la transcripción de los genes diana. La complejidad de la vía y su implicación en numerosos procesos biológicos ha determinado el desarrollo de diferentes mecanismos de regulación tanto extracelulares como intracelulares <sup>14, 15</sup>. En lo referente a sus funciones biológicas estas proteínas desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de diferentes tejidos y órganos, incluyendo la hematopoyesis <sup>16</sup>. Son responsables junto a otros factores de la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis de los precursores hematopoyéticos, así como de las células del sistema inmunitario <sup>17-22</sup>. Asimismo, regulan la biología de los componentes celulares que forman el nicho medular <sup>16, 23</sup>. Es por ello que no resulta extraña su implicación en el desarrollo y progresión de enfermedades incluyendo los procesos tumorales. En este sentido, la mayor parte de los estudios realizados en pacientes con neoplasias hematológicas han mostrado una expresión aberrante de los componentes de la vía que correlaciona con una menor supervivencia <sup>24-26</sup>. Sin embargo, aún se desconoce el papel concreto que desempeñan estas alteraciones en la biología del tumor, habiéndose descrito efectos tanto pro- como antitumorales, que van a depender del tipo de tumor, su estadio y/o el desarrollo o no de recaídas.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos del presente trabajo son:

1. Analizar el comportamiento inmunomodulador de las células madre mesenquimales de pacientes de leucemia linfoblástica aguda en el momento del diagnóstico y a lo largo del tratamiento, en relación con la función de las células NK.
2. Determinar los mecanismos que median esta función inmunomoduladora.
3. Analizar en las MSCs la expresión de los componentes de la vía de señalización BMP así como la posible implicación en sus propiedades inmunomoduladoras.
4. Analizar la expresión de los componentes de la vía de señalización BMP en las células leucémicas y su capacidad para modular la susceptibilidad de estas células a la lisis mediada por células NK.
5. Estudiar la interacción de las células leucémicas con la población de células NK y evaluar las posibles alteraciones en la función antitumoral de estas últimas.
6. Estudiar la interacción de las células leucémicas y la población de células NK.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Aspirados de médula ósea de pacientes pediátricos diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda tipo B del Hospital Universitario del Niño Jesús fueron obtenidos en el momento del diagnóstico y a distintos tiempos a lo largo del tratamiento quimioterápico. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de dicho hospital, tras consentimiento escrito informado de los padres/tutores. Se obtuvieron además muestras de pacientes pediátricos ya recuperados fuera de tratamiento y de donantes sanos. Las MSCs se aislaron en base a su capacidad para adherirse al plástico, a partir de células mononucleares de los aspirados. Posteriormente se cultivaron en medio específico y se determinó su fenotipo y capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica. Se usaron para estudios de citometría de flujo y producción de citoquinas y quimioquinas.

Líneas leucémicas ya establecidas se usaron para estudios de proliferación, viabilidad y determinación de la expresión de diferentes moléculas mediante citometría de flujo y PCR



cuantitativa, tras cultivo con BMP4. Los estudios de PCR cuantitativa se realizaron también con muestras primarias de pacientes.

La población de células NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> se aisló usando el kit específico CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech, Auburn) a partir de células mononucleares obtenidas de *buffy coats* de donantes sanos del Centro de Transfusiones (Comunidad de Madrid, Spain). Se establecieron cocultivos con MSCs o células leucémicas para el análisis de su capacidad citotóxica, fenotipo y producción de citoquinas. Se cultivaron en presencia de IL12 (10ng/ml) e IL15 (100ng/ml), adicionando, según el caso, alguno de los compuestos indicados: BMP4 (0,01 - 100ng/ml), DAPT (50μM), DMH1 (10μM), BMPRIA Fc (3μg/ml), NS-398 (5μM), anti TGF-β1, 2, 3 (10μg/ml), Noggin (500ng/ml).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran la capacidad de las MSCs, aisladas de los pacientes de los grupos de riesgo bajo/intermedio de recaída, de estimular la funcionalidad de las células NK, incluso por encima de la exhibida en condiciones control, induciendo su capacidad citotóxica, producción de citoquinas proinflamatorias y expresión de proteínas mediadoras de la lisis celular e inhibiendo la regulación negativa de los receptores de activación. Dicha capacidad inmunoestimuladora contrasta con la de MSCs de donantes sanos y pacientes del grupo de riesgo alto, con función inmunosupresora, y va reduciéndose a medida que se avanza en el tratamiento y recuperación de los pacientes. Esta incapacidad de las MSCs de los pacientes de inhibir la función de las células del sistema inmunitario también ha sido descrita en otros trabajos utilizando MSCs derivadas de pacientes con otras enfermedades hematológicas<sup>5, 6, 8, 27, 28</sup>. Entre ellos destaca el trabajo de Wang y colaboradores donde observaron la capacidad de las MSCs de pacientes con síndrome mielodisplásico con bajo riesgo de recaída de estimular la actividad de células dendríticas<sup>8</sup>. Así, nuestros resultados sugieren la posibilidad de un comportamiento inmunomodulador diferencial entre las MSCs de pacientes con riesgo bajo o intermedio de recaída en la enfermedad y las de pacientes con riesgo alto de recaída, que puede ser determinante en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

La exposición de las MSCs de donantes sanos a células leucémicas de bajo riesgo indujo un comportamiento inmunoestimulador similar al de las MSCs de pacientes, mediada en parte

por una menor producción de TGF- $\beta$ . Esta interacción célula tumoral: MSCs también ha sido analizada por otros grupos, encontrando alteraciones en la producción de factores solubles que se han interpretado como mecanismos desarrollados por el tumor para favorecer su propio desarrollo, sin analizar su función sobre las células del sistema inmunitario<sup>29-32</sup>.

Nuestros resultados muestran que las MSCs de los pacientes, además de reducir la producción de PGE2 y TGF- $\beta$ , factores inhibidores de la capacidad funcional de las células NK<sup>33, 34</sup>, incrementan la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y reducen la expresión de las moléculas inhibidoras PD-L1 y PD-L2. Resultados similares han sido observados por otros autores en MSCs aisladas de pacientes con síndrome mielodisplásico<sup>8,27</sup>. Asimismo aumentan la expresión de TLR4 y Jagged1, cambios asociados a un perfil inmunoestimulador de las MSCs capaz de hacer frente a la transformación maligna<sup>35, 36</sup>. Por último encontramos un aumento en la producción de BMP4, ligando de la vía de señalización BMP cuya expresión se ha visto alterada en diferentes tumores pero del que aún no se sabe con certeza su papel en el desarrollo de este. Sin embargo, en nuestro modelo, este ligando podría estar implicado en la adquisición de las propiedades inmunoestimuladoras de las MSCs del nicho tumoral, si bien parece necesaria la presencia de otros factores.

En lo referente al papel de la vía de señalización BMP en el desarrollo de la LLA, la activación exógena de la vía indujo una reducción en la capacidad proliferativa, sin alterar la viabilidad, exclusivamente en células leucémicas con bajo riesgo de recaída. Asimismo, los resultados demuestran que la presencia del ligando induce la expresión de los ligandos para los receptores NKG2D y NKp30 y que dicho incremento podría favorecer la acción lítica de las células NK, como han observado otros autores<sup>37</sup>. El análisis de estos mismos ligandos en muestras primarias reveló una reducción en la expresión de B7H6, ligando de NKp30, en pacientes que habían recaído en la enfermedad con independencia de su grupo de riesgo, que correlacionaba con una menor supervivencia, lo que podría ser un factor pronóstico importante para la evolución de la enfermedad. Por otro lado observamos en estas mismas muestras una alteración en el perfil fenotípico de las células NK presentes en la médula ósea, que se tradujo en un menor grado de activación, concretamente en pacientes con peor pronóstico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos en estudios con pacientes con otras enfermedades hematológicas, que también observaron

una función comprometida de las células NK infiltrantes de tumor <sup>11, 38-40</sup>. Asimismo, observamos una reducción en la expresión de BMPRIA, receptor de la vía de señalización BMP esencial para la funcionalidad de estas células <sup>21</sup>. Finalmente comprobamos que estos cambios eran dependientes de las células leucémicas, dado que su presencia alteró el patrón fenotípico de las células NK que se tradujo en una menor capacidad funcional.

## CONCLUSIONES

1. Las células madre mesenquimales aisladas de la médula ósea de pacientes de leucemia linfoblástica aguda con riesgo bajo/intermedio de recaída promueven la actividad citotóxica de las células NK estimulando su acción antitumoral. Por el contrario, las células aisladas de los pacientes con elevado riesgo de recaída presentan un comportamiento inmunosupresor similar al de las células de donantes sanos.
2. Los mecanismos responsables del cambio en el comportamiento inmunomodulador de las MSCs de los pacientes de LLA de bajo/intermedio riesgo incluyen secreción diferencial de factores solubles como TGF- $\beta$  y PGE2 y cambios en la expresión de TLRs y moléculas coestimuladoras (CD40, CD86) e inhibidoras (PDL-1, PDL-2).
3. Los estudios longitudinales indican que estas propiedades inmunoestimuladoras de las MSC-LLA se atenúan progresivamente en correlación con la renovación de estas células en una médula ósea libre de leucemia.
4. Las MSC de donantes sanos adoptan características inmunomoduladoras propias de las MSCs de los pacientes de LLA cuando son expuestas a células leucémicas.
5. Las MSCs aisladas de los pacientes en el momento del diagnóstico producen niveles incrementados de BMP4, ligando que es responsable, junto con otros factores, de los cambios observados en la función inmunomoduladora.

6. La estimulación de la vía de señalización BMP reduce la capacidad proliferativa, sin alterar la viabilidad, de células leucémicas catalogadas de riesgo bajo de recaída. Asimismo, incrementa la susceptibilidad de dichas células a la lisis mediada por las células NK al aumentar los niveles de expresión de los ligandos MICB, ULBP3 y B7H6 para receptores de activación.
7. Como consecuencia directa de la presencia de las células leucémicas, las células NK presentes en la médula ósea de pacientes de LLA de riesgo alto o que han recaído, presentan un patrón de expresión de receptores activadores e inhibidores que sugieren una menor funcionalidad de las mismas respecto al patrón exhibido por células NK de pacientes de bajo/intermedio riesgo. Concretamente, los bajos niveles de expresión del receptor activador NKp30 en las células NK de la médula ósea, junto con los niveles reducidos de su ligando B7H6 en las células leucémicas de estos pacientes, podrían ser relevantes para la evolución de la enfermedad.
8. La señalización BMP autocrina, a través de BMPRIA, sería responsable de la funcionalidad de las células NK en la enfermedad.

---

## RELEVANCE OF TUMOR MICROENVIRONMENT IN THE DEVELOPMENT OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: ROLE OF BMP4.

### INTRODUCTION

Acute lymphoblastic leukaemia is the most common childhood malignancy, caused by multiple factors. These factors, that include exogenous and endogenous exposures and genetic susceptibility, disrupt proliferation and differentiation ability of lymphoid precursors, which accumulate in bone marrow. Although risk-directed trials of chemotherapy have resulted in long-term event free survival rates of 90%, approximately 10-15% of children relapse <sup>1</sup>. In recent years, several reports have emphasized the importance of bone marrow microenvironment in the development of the disease. In particular, they have studied the characteristics of mesenchymal stem cells (MSCs), key components of the microenvironment involved in the maintenance of leukemic cells. These studies reported differences in proliferation and differentiation ability, cytokine production and, to a lesser extent, immunomodulatory activity, between MSCs isolated from patients with different hematopoietic disorders and healthy donors <sup>2-6</sup>. However, in most cases, these alterations have been suggested to be directed by tumor cells for their own benefit <sup>5-7</sup>. Likewise, in a study with myelodysplastic syndrome patients, authors have found that MSCs from high-risk and low-risk patients exhibit differences in immunomodulatory capacities on DC maturation, which would be decisive in disease prognosis <sup>8</sup>.

NK cells are a subset of lymphoid cells, which constitutively express lytic machinery able to kill infected or tumor cells, and produce cytokines and chemokines that promote adaptive immune response <sup>9</sup>. These cells are the major effector antitumor agents; however, their activity may be eluded by the tumor microenvironment <sup>10-12</sup>. Thus, tumor cells can evade NK cell mediated antitumor activity by various mechanisms, mainly downregulation of NK cell activating receptors and upregulation of inhibitory receptors. Alternatively, they release soluble ligands for the activating NKG2D and NKp30 receptors <sup>13</sup>.

The bone morphogenetic proteins (BMPs) are secreted growth factors belonging to the TGF- $\beta$  superfamily, originally described by their capacity to induce bone and cartilage formation. However, further studies have revealed their essential role during embryogenesis and adult development. BMP ligands bind to hetero-tetrameric complex

receptors composed by two type I receptors (BMPRIA, BMPRIB, ActRIA) and two type II receptors (BMPRII, ActRIIA, ActRIIB). Upon BMP binding, type II receptors, which have constitutive kinase activity, phosphorylate type I receptors. Then, BMP-receptor regulated Smad proteins (BR-Smad) are activated by these receptors and form complexes with the common Smad (Co-Smad, Smad4) that are translocated to the nucleus where they modulate the expression of several target genes, included ID and RUNX genes. The complexity of this signalling pathway and its implication in several biological features has determined the existence of a range of intracellular and extracellular regulators<sup>14,15</sup>.

Concerning BMP functions, they are multifunctional factors involved in the homeostasis of a wide array of organs in the adult state, including hematopoietic system<sup>16</sup>. They regulate, together with different factors, the proliferation, differentiation, migration and apoptosis of hematopoietic stem cells and immune cells<sup>17-22</sup>. Moreover, they are implicated in the regulation of different components of the bone marrow microenvironment<sup>16,23</sup>. Therefore, it is not surprising its role in the development and progression of different diseases, including tumors. Several studies in hematopoietic malignancies have shown a correlation between overall-survival and aberrant expression of components of the BMP signalling pathway<sup>24-26</sup>. However, the role of these ligands and receptors during disease progression is not clear, since they can function as tumor promoters or tumor suppressors depending on type, grade, stage and recurrence of tumors.

## OBJECTIVE

The objective of the present work will be:

1. To analyse the immunomodulatory function of MSCs derived from newly diagnosed acute lymphoblastic leukemic (ALL) patients on NK cells and the possible alterations on the mediators of these properties.
2. To analyse the expression of the machinery for BMP signalling and its implication on the immunomodulatory properties of MSCs derived from ALL patients.
3. To evaluate the importance of BMP signalling on the biology of leukemic cells and the strategies for immune evasion.
4. To study the interaction between leukemic cells and NK cells and evaluate the possible alterations on the tumor activity of these cells.

## MATERIALS AND METHODS

Bone marrow samples were obtained from children diagnosed of ALL at diagnosis and at different times after initiation of therapy. The study was approved by the Ethic Committee of Clinical Research at Hospital Universitario del Niño Jesús and written informed consent was obtained from parents/tutors. Aspirates were also obtained from patients recovered without signs of disease and were out of therapy, and from children with no hematological disease. MSCs were isolated by the classical adhesion method and cultured and expanded in specific medium. Their phenotypic features and adipogenic and osteogenic ability were determined. They were analysed for the expression of different molecules and the production of cytokines and chemokines by flow cytometry and ELISA, respectively.

Survival, proliferation ability and phenotype of BMP4 treated acute lymphoblastic leukemic cell lines were studied by flow cytometry and quantitative real time PCR. Primary human leukemic cells were also used for quantitative real time PCR analysis.

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from *buffy coats* of healthy donors (Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid, Spain) by Ficoll-Paque density gradient centrifugation. CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>NK cell subset were isolated using the CD56+CD16+NK cell isolation kit (Miltenyi Biotec). NK cells were used in cocultures with MSCs from ALL patients and healthy donors, and with leukemic cell lines. They were coculture in media supplemented with IL12 (10ng/ml) and IL15 (100ng/ml) and their cytotoxic activity, phenotype and cytokine production were evaluated. Where indicated, the following factors were added: BMP4 (0,01 - 100ng/ml), DAPT (50μM), DMH1 (10μM), BMPRIA Fc (3μg/ml), NS-398 (5μM), anti TGF-β1, 2, 3 (10μg/ml), Noggin (500ng/ml).

## RESULTS AND DISCUSION

Our results show the ability of MSCs derived from bone marrow of patients with low/intermediate risk acute lymphoblastic leukemia to promote NK cell cytotoxic activity, compared not only to NK cells cultured with MSCs derived from healthy donors, but also to those cultured alone. In accordance with this alteration, MSCs from those patients were able to increase IFNγ and TNFα production and granzyme and perforin expression, both proteins related to lytic activity. Moreover, these MSCs were not able to inhibit the

expression of activation markers on NK cells. We also evaluated whether this immunomodulatory behaviour of MSCs derived from low/intermediate risk patients at diagnosis was maintained along the course of the disease. Although individual variability exists, MSCs from treated patients progressively recover the immunosuppressive capacities and MSCs obtained from patients out of treatment show similar immunosuppressive capacities to MSCs from healthy donors. On the other hand, MSCs obtained from patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia showed an immunosuppressive capacity similar to that exhibited by MSCs from healthy patients. Therefore, our findings show a differential immunomodulatory behaviour of MSCs from low/intermediate risk patients and high-risk patients that may be relevant in the diagnosis and progression of the disease. Other studies have analysed the effect of MSCs from patients with different hematopoietic diseases on T cell function. The results obtained in those reports showed a poor or no ability of MSCs of patients to inhibit T cell proliferation, which correlated with similar expression of T cell activation markers in activated T cells cocultured with MSCs from patients and in activated T cells cultured alone. In all cases, T cell activation was higher than that exhibited by T cells cultured with MSCs from healthy donors<sup>5, 6, 8, 27, 28</sup>. In fact, Wang et al have recently described a differential immunoregulatory role of MSCs derived from low-risk and high-risk myelodysplastic syndrome patients on DC maturation<sup>8</sup>.

The presence of leukemic cells induced an immunomodulatory behaviour on MSCs from healthy donors similar to that observed on MSCs from ALL patients and was mediated by a significant decrease on TGF- $\beta$  production. These results are in agreement with other reports which showed changes in cytokine production by stromal cells after exposure to tumor cells. However, in all cases those changes were attributed to be mediated by tumor cells for their own maintenance and not as a mechanism of MSCs to face up the tumor development<sup>29-32</sup>.

In agreement, the fact that MSCs from ALL patients have an immunostimulatory behaviour was associated with a reduction of the mechanisms underlying the MSCs-mediated inhibitory effects. The changes included a significant decrease in the production of PGE2 and TGF- $\beta$ , soluble factors that mediated suppression of NK cell function<sup>33, 34</sup>, an increase production in proinflammatory cytokines and chemokines and a reduced expression of PD-L1 and PD-L2 on MSCs from ALL patients. Similar results have been described from MSCs



derived from patients with myelodysplastic syndrome<sup>8, 27</sup>. Moreover, MSCs derived from patients increased TLR4 and Jagged1 expression, both associated with an immunostimulatory MSC1 phenotype with antitumor effects<sup>35, 36</sup>. We also found an increase in BMP4 production in those MSCs that could be implicated in the alterations observed. Our results also showed the role of BMP signalling pathway on disease progression, since the exogenous activation of that pathway reduced the proliferation ability of low-risk leukemic cells. In addition, the presence of BMP4 ligand increased their susceptibility to NK cell-mediated antitumor activity through upregulation of NKG2D and Nkp30 ligands. Recently, Schlegel *et al* showed in ALL patients that the up-regulation of NKG2D ligands increased the susceptibility of leukemic cells to NK cell mediated death<sup>37</sup>.

In addition, we evaluated the expression of those ligands on primary leukemic cells and found a reduction on B7H6, ligand for Nkp30, in relapsed ALL patients, which correlated with a reduction in overall survival. Moreover, we found in patients with worse prognosis a reduced expression of activation markers as well as natural cytotoxicity receptors and increased levels of the inhibitory receptors in bone marrow NK cells. Similar results were observed by other authors in patients with chronic lymphocytic leukemia, acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome<sup>11, 38-40</sup>. Together with these changes, we observed a significant reduction of BMPRIA expression, a type I BMP receptor which mediates BMP signalling pathway, essential for optimal NK cell effector function<sup>21</sup>. We also demonstrated that these alterations were mediated by leukemic cells, since their presence reduced NK cell function.

## CONCLUSIONS

1. MSCs derived from low/intermediate risk ALL patients promote NK cell cytotoxic activity. On the other hand, MSCs obtained from patients with high risk ALL show an immunosuppressive capacity similar to that exhibited by MSCs from healthy donors.
2. This immunostimulatory behaviour is associated with alterations in the mechanisms underlying the MSCs-mediated inhibitory effects, which include the differential secretion of soluble factors (TGF- $\beta$  and PGE2) and alterations in the expression profile of TLRs, costimulatory (CD40, CD86) and inhibitory (PD-L1, PD-L2) molecules.

3. The immunostimulatory behaviour of MSCs from ALL patients is gradually attenuated in correlation with the absence of leukemic cells.
4. The presence of leukemic cells induce an immunostimulatory behaviour on MSCs from healthy donors.
5. MSCs obtained from ALL patients produce large amounts of BMP4 ligand, which is also responsible of the alterations observed.
6. The exogenous activation of BMP signalling pathway reduce the proliferation ability of low-risk leukemic cells and increase their susceptibility to NK cell mediated death through upregulation of the NKG2D and NKp30 ligands, MICB, ULBP3 and B7H6. In correlation, these patients show a reduction of NKp30 ligand expression on leukemic cells.
7. Autocrine BMP signalling pathway is responsible of NK cell functionality during disease progression.

## REFERENCES

1. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. *Acute Lymphoblastic Leukaemia*. Lancet 381:1943-1955, **(2013)**.
2. Pavlaki K, Pontikoglou CG, Demetriadou A, Batsali AK, Damianaki A, Simantirakis E, Kontakis M, Galanopoulos A, Kotsianidis I, Kastrinaki MC, Papadaki HA. *Impaired Proliferative Potential of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Patients with Myelodysplastic Syndromes Is Associated with Abnormal Wnt Signaling Pathway*. Stem Cells Dev 23:1568-1581, **(2014)**.
3. Binato R, de Almeida Oliveira NC, Du Rocher B, Abdelhay E. *The Molecular Signature of Aml Mesenchymal Stromal Cells Reveals Candidate Genes Related to the Leukemogenic Process*. Cancer Lett 369:134-143, **(2015)**.
4. Zhao Y, Wu D, Fei C, Guo J, Gu S, Zhu Y, Xu F, Zhang Z, Wu L, Li X, Chang C. *Down-Regulation of Dicer1 Promotes Cellular Senescence and Decreases the Differentiation and Stem Cell-Supporting Capacities of Mesenchymal Stromal Cells in Patients with Myelodysplastic Syndrome*. Haematologica 100:194-204, **(2015)**.
5. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, Dessoly J, Sciaïni AK, Benbunan M, Chomienne C, Fermand JP, Marolleau JP, et al. *Phenotypic and Functional Characterization of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Derived from Patients with Multiple Myeloma*. Leukemia 21:158-163, **(2007)**.
6. Xishan Z, Guangyu A, Yuguang S, Hongmei Z. *The Research on the Immuno-Modulatory Defect of Mesenchymal Stem Cell from Chronic Myeloid Leukemia Patients*. J Exp Clin Cancer Res 30:47, **(2011)**.
7. Conforti A, Biagini S, Del Bufalo F, Sirleto P, Angioni A, Starc N, Li Pira G, Moretta F, Proia A, Contoli B, Genovese S, Ciardi C, et al. *Biological, Functional and Genetic Characterization of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Pediatric Patients Affected by Acute Lymphoblastic Leukemia*. PLoS One 8:e76989, **(2013)**.
8. Wang Z, Tang X, Xu W, Cao Z, Sun L, Li W, Li Q, Zou P, Zhao Z. *The Different Immunoregulatory Functions on Dendritic Cells between Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow of Patients with Low-Risk or High-Risk Myelodysplastic Syndromes*. PLoS One 8:e57470, **(2013)**.
9. Caligiuri MA. *Human Natural Killer Cells*. Blood 112:461-469, **(2008)**.
10. Pietra G, Vitale M, Moretta L, Mingari MC. *How Melanoma Cells Inactivate Nk Cells*. Oncoimmunology 1:974-975, **(2012)**.
11. Costello RT, Knoblauch B, Sanchez C, Mercier D, Le Treut T, Sebahoun G. *Expression of Natural Killer Cell Activating Receptors in Patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia*. Immunology 135:151-157, **(2012)**.
12. Castriconi R, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Castellano A, Locatelli F, Corrias MV, Moretta A, Bottino C. *Neuroblastoma-Derived Tgf-Beta1 Modulates the Chemokine Receptor Repertoire of Human Resting Nk Cells*. J Immunol 190:5321-5328, **(2013)**.
13. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. *Effect of Tumor Cells and Tumor Microenvironment on Nk-Cell Function*. Eur J Immunol 44:1582-1592, **(2014)**.
14. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. *Bone Morphogenetic Protein Receptors and Signal Transduction*. J Biochem 147:35-51, **(2010)**.

15. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. *Bone Morphogenetic Proteins: A Critical Review*. Cell Signal 23:609-620, **(2010)**.
16. Goldman DC, Bailey AS, Pfaffle DL, Al Masri A, Christian JL, Fleming WH. *Bmp4 Regulates the Hematopoietic Stem Cell Niche*. Blood 114:4393-4401, **(2009)**.
17. Soderberg SS, Karlsson G, Karlsson S. *Complex and Context Dependent Regulation of Hematopoiesis by Tgf-Beta Superfamily Signaling*. Ann N Y Acad Sci 1176:55-69, **(2009)**.
18. Martinez VG, Sacedon R, Hidalgo L, Valencia J, Fernandez-Sevilla LM, Hernandez-Lopez C, Vicente A, Varas A. *The Bmp Pathway Participates in Human Naive Cd4+ T Cell Activation and Homeostasis*. PLoS One 10:e0131453, **(2015)**.
19. Martinez VG, Hernandez-Lopez C, Valencia J, Hidalgo L, Entrena A, Zapata AG, Vicente A, Sacedon R, Varas A. *The Canonical Bmp Signaling Pathway Is Involved in Human Monocyte-Derived Dendritic Cell Maturation*. Immunol Cell Biol 89:610-618, **(2011)**.
20. Zetterblad J, Qian H, Zandi S, Mansson R, Lagergren A, Hansson F, Bryder D, Paulsson N, Sigvardsson M. *Genomics Based Analysis of Interactions between Developing B-Lymphocytes and Stromal Cells Reveal Complex Interactions and Two-Way Communication*. BMC Genomics 11:108, **(2010)**.
21. Robson NC, Hidalgo L, Mc Alpine T, Wei H, Martinez VG, Entrena A, Melen GJ, MacDonald AS, Phythian-Adams A, Sacedon R, Maraskovsky E, Cebon J, et al. *Optimal Effector Functions in Human Natural Killer Cells Rely Upon Autocrine Bone Morphogenetic Protein Signaling*. Cancer Res 74:5019-5031, **(2014)**.
22. Kersten C, Dosen G, Myklebust JH, Sivertsen EA, Hystad ME, Smeland EB, Rian E. *Bmp-6 Inhibits Human Bone Marrow B Lymphopoiesis--Upregulation of Id1 and Id3*. Exp Hematol 34:72-81, **(2006)**.
23. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, et al. *Identification of the Haematopoietic Stem Cell Niche and Control of the Niche Size*. Nature 425:836-841, **(2003)**.
24. Laperrousaz B, Jeanpierre S, Sagorny K, Voeltzel T, Ramas S, Kaniewski B, Ffrench M, Salesse S, Nicolini FE, Maguer-Satta V. *Primitive Cml Cell Expansion Relies on Abnormal Levels of Bmps Provided by the Niche and on Bmprib Overexpression*. Blood 122:3767-3777, **(2013)**.
25. Grcevic D, Marusic A, Grahovac B, Jaksic B, Kusec R. *Expression of Bone Morphogenetic Proteins in Acute Promyelocytic Leukemia before and after Combined All Trans-Retinoic Acid and Cytotoxic Treatment*. Leuk Res 27:731-738, **(2003)**.
26. Dzierzzenia J, Wrobel T, Jazwiec B, Mazur G, Butrym A, Poreba R, Kuliczowski K. *Expression of Bone Morphogenetic Proteins (Bmps) Receptors in Patients with B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL)*. Int J Lab Hematol 32:e217-221, **(2010)**.
27. Zhao ZG, Xu W, Yu HP, Fang BL, Wu SH, Li F, Li WM, Li QB, Chen ZC, Zou P. *Functional Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow of Patients with Myelodysplastic Syndromes*. Cancer Lett 317:136-143, **(2012)**.
28. Andre T, Meuleman N, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Pieters K, Bron D, Lagneaux L. *Evidences of Early Senescence in Multiple Myeloma Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells*. PLoS One 8:e59756, **(2013)**.
29. Medyouf H, Mossner M, Jann JC, Nolte F, Raffel S, Herrmann C, Lier A, Eisen C, Nowak V, Zens B, Mudder K, Klein C, et al. *Myelodysplastic Cells in Patients*

- Reprogram Mesenchymal Stromal Cells to Establish a Transplantable Stem Cell Niche Disease Unit*. *Cell Stem Cell* 14:824-837, **(2014)**.
30. Zdzisinska B, Bojarska-Junak A, Dmoszynska A, Kandefer-Szerszen M. *Abnormal Cytokine Production by Bone Marrow Stromal Cells of Multiple Myeloma Patients in Response to Rpmi8226 Myeloma Cells*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56:207-221, **(2008)**.
  31. Bisping G, Leo R, Wenning D, Dankbar B, Padro T, Kropff M, Scheffold C, Kroger M, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. *Paracrine Interactions of Basic Fibroblast Growth Factor and Interleukin-6 in Multiple Myeloma*. *Blood* 101:2775-2783, **(2003)**.
  32. Lokhorst HM, Lamme T, de Smet M, Klein S, de Weger RA, van Oers R, Bloem AC. *Primary Tumor Cells of Myeloma Patients Induce Interleukin-6 Secretion in Long-Term Bone Marrow Cultures*. *Blood* 84:2269-2277, **(1994)**.
  33. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. *Mesenchymal Stem Cells Inhibit Natural Killer-Cell Proliferation, Cytotoxicity, and Cytokine Production: Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Prostaglandin E2*. *Blood* 111:1327-1333, **(2008)**.
  34. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. *Interactions between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells*. *Stem Cells* 24:74-85, **(2006)**.
  35. Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM. *Mesenchymal Stem Cell 1 (Msc1)-Based Therapy Attenuates Tumor Growth Whereas Msc2-Treatment Promotes Tumor Growth and Metastasis*. *PLoS One* 7:e45590, **(2012)**.
  36. Betancourt AM. *New Cell-Based Therapy Paradigm: Induction of Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells into Pro-Inflammatory Msc1 and Anti-Inflammatory Msc2 Phenotypes*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 130:163-197, **(2012)**.
  37. Schlegel P, Ditthard K, Lang P, Mezger M, Michaelis S, Handgretinger R, Pfeiffer M. *Nkg2d Signaling Leads to Nk Cell Mediated Lysis of Childhood Aml*. *J Immunol Res* 2015:473175, **(2015)**.
  38. Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, Rollison DE, Salih HR, Krusch M, Zou J, Ku E, Zhong B, Boulware D, Moscinski L, Wei S, et al. *Reduced Natural Killer (Nk) Function Associated with High-Risk Myelodysplastic Syndrome (Mds) and Reduced Expression of Activating Nk Receptors*. *Blood* 109:4816-4824, **(2007)**.
  39. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty D, Olive D, Costello RT. *Deficient Expression of Ncr in Nk Cells from Acute Myeloid Leukemia: Evolution During Leukemia Treatment and Impact of Leukemia Cells in Ncrdull Phenotype Induction*. *Blood* 109:323-330, **(2007)**.
  40. Khaznadar Z, Boissel N, Agaue S, Henry G, Cheok M, Vignon M, Geromin D, Cayuela JM, Castaigne S, Pautas C, Raffoux E, Lachuer J, et al. *Defective Nk Cells in Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis Are Associated with Blast Transcriptional Signatures of Immune Evasion*. *J Immunol* 195:2580-2590, **(2015)**.

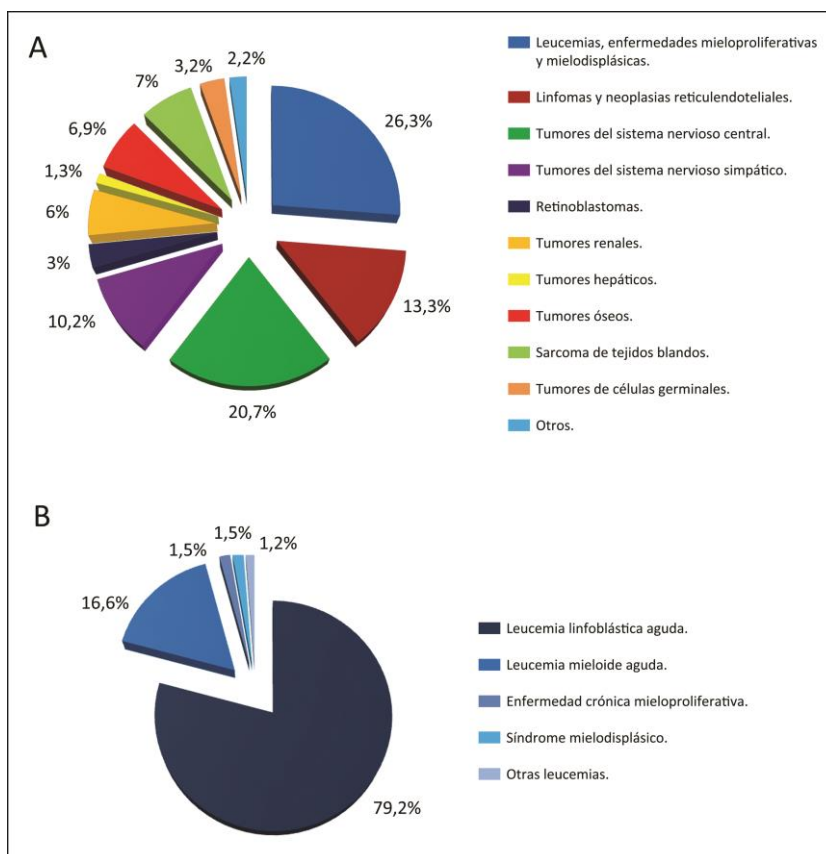
## **INTRODUCCIÓN**



## 1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.

### 1.1. Características generales.

Según los últimos datos del Registro Nacional de Tumores Infantiles-Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (RNTI-SEHOP-), las leucemias son las neoplasias que se diagnostican con mayor frecuencia en edad infantil, constituyendo un 26,3% de los casos de cáncer en esa edad. Dentro de ellas, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) constituye el 79,2% de los casos, siendo la enfermedad hematológica más frecuente en edad pediátrica. Aunque afecta también a personas en edad adulta, su pico de incidencia se encuentra entre los 2 y 5 años de edad, diagnosticándose en este periodo un 48% de los casos de LLA <sup>1</sup> (Figura 1).





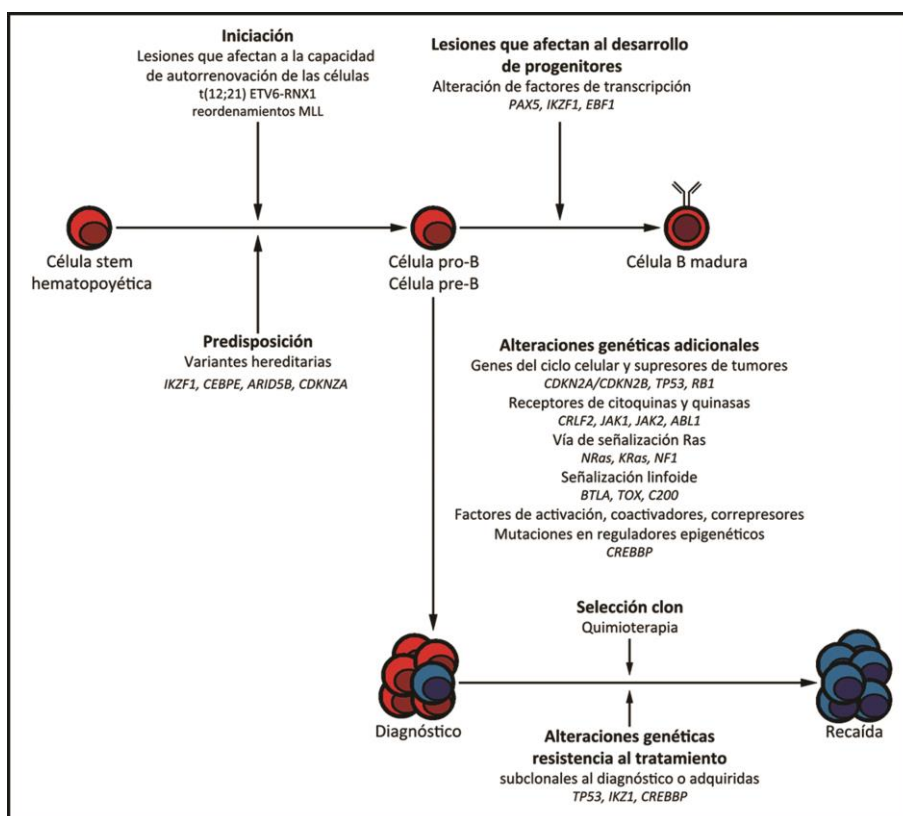
**Figura 1: Clasificación de tumores infantiles.** (A) Frecuencia de neoplasias más comunes en edad pediátrica. (B) Subtipos de leucemia más frecuentes en edad infantil. Datos tomados del Registro Nacional de Tumores Infantiles - Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (RNTI-SEHOP).

En la actualidad la tasa de supervivencia de los pacientes pediátricos afectados por esta enfermedad es del 90%; sin embargo, entre un 10 y un 15% de los pacientes siguen recayendo, lo que hace necesario el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico así como nuevas terapias para reducir estos casos <sup>2</sup>.

## 1.2. Fisiopatología de la enfermedad.

Como en otras neoplasias, también en la LLA la secuencia de acontecimientos que derivan en la transformación maligna de la célula es multifactorial. En el caso de la LLA estos eventos se producen durante la diferenciación de las estirpes linfoides T o B, incrementando la tasa proliferativa de los progenitores y favoreciendo la aparición de mutaciones espontáneas y de otras alteraciones citogenéticas que facilitan la transformación maligna. En concreto la leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B) es una enfermedad heterogénea causada en un 75% por alteraciones genéticas primarias que incluyen hiperdiploidías (ganancia de al menos cinco cromosomas entre los que se encuentran el X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, y 21), hipodiploidías (número de cromosomas inferior a 44), translocaciones cromosómicas (translocación t(12;21)(p13;q22) que codifica para la proteína de fusión *ETV6-RUNX1/TEL-AML1*; la translocación t(1;19)(q23;p13) que codifica para la proteína *TCF3-PBX1/E2A-PBX1* y la translocación t(9;22)(q34;q11) que codifica para la proteína *BCR-ABL1*) o reordenamientos en oncogenes. Junto con estas alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas coexisten y cooperan mutaciones en genes que incluyen genes supresores de tumores y del ciclo celular (*TP53*, *CDKN*), genes implicados en el desarrollo linfoide (*PAX5*, *IKZF1*), reguladores de la apoptosis (*BTG1*), receptores de glucocorticoides (*NR3C1*), receptores de citoquinas (*JAK2*) y genes de la vía de señalización de Ras (*NRAS*, *KRAS*) <sup>3, 4</sup>. Igualmente, alteraciones epigenéticas contribuyen al desarrollo de la enfermedad, entre las que se incluyen la metilación del ADN o la modificación postraducciona de histonas <sup>5</sup> (Figura 2). Según los últimos estudios, los factores implicados en la etiología de la enfermedad incluyen, además de una predisposición genética, diferentes factores medioambientales de efecto leucemógeno e infecciones víricas o bacterianas<sup>2</sup>. Estos factores contribuirían a la aparición de alteraciones

citogenéticas en etapas tempranas del desarrollo linfoide, afectando a la capacidad de renovación de los progenitores. Seguidamente, estas mismas alteraciones o la aparición de otras secundarias llevarían a su arresto en etapas tempranas del desarrollo. Finalmente, alteraciones genéticas submicroscópicas en las diferentes vías antes mencionadas permitirían el desarrollo de la enfermedad (Figura 2). Todos estos cambios contribuirían a la aparición de la enfermedad, siendo responsables de la gran heterogeneidad de esta <sup>2, 4</sup>.



**Figura 2: Fisiopatología de la leucemia linfoblástica aguda tipo B en el momento del diagnóstico y en las recaídas.** Se muestran las alteraciones genéticas y citogenéticas más representativas y su relación con el desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda (Modificado de Hunger et al 2015).

### 1.3. Clínica, diagnóstico y estratificación de los pacientes: grupos de riesgo.

La presentación clínica de la LLA incluye insuficiencia medular causada por la proliferación de los blastos leucémicos en la médula ósea, que se manifiesta en anemia, trombocitopenia y neutropenia. Otros síntomas habituales son la pérdida de apetito, fiebre, sensación de cansancio y fatiga, dolores musculares, articulares y óseos, hematomas y hemorragias

espontáneas. En algunos casos los pacientes pueden presentar infecciones así como adenopatías y hepatoesplenomegalia. Por otra parte, los síntomas derivados de la infiltración de otros tejidos y órganos son dolor e hinchazón de testículos; dolor óseo, somnolencia; y vómitos y dolores de cabeza derivados de la infiltración en sistema nervioso central.

El diagnóstico preciso de la enfermedad se realiza mediante extracciones de sangre y aspirados de médula ósea para su análisis morfológico, fenotípico, citogenético y molecular. Se suele incluir una punción lumbar para descartar la infiltración en sistema nervioso central, así como radiografías para comprobar el tamaño del bazo, hígado y ganglios linfáticos.

La identificación morfológica y fenotípica de la enfermedad se realiza mediante el empleo de técnicas de microscopía y citometría de flujo. La expresión de determinados marcadores en la membrana de las células leucémicas permite conocer su grado de diferenciación, algo de gran relevancia en el tratamiento de la enfermedad. Así según el estadio madurativo de los linfoblastos se establecen los siguientes tipos de LLA-B: pro-B, B común, pre-B y B maduro, siendo el más inmaduro el de mayor gravedad <sup>6</sup>.

El análisis genético permite la identificación de prácticamente el 100% de las anomalías citogenéticas de las células leucémicas. Muchas de estas alteraciones se asocian significativamente al pronóstico de la enfermedad por lo que son utilizadas en el establecimiento de los grupos de riesgo. Así, una alta hiperploidía y el gen de fusión *ETV6-RUNX1* son factores de pronóstico favorable mientras que una hipodiploidía y el reordenamiento *MLL* son factores predictores de un pronóstico peor asociado a alto riesgo de recaída <sup>7</sup>.

El incremento de la tasa de supervivencia de estos pacientes se debe al empleo de una terapia dirigida según el riesgo de recaída en la enfermedad, permitiendo administrar el tratamiento más adecuado y menos tóxico a cada paciente. Así, aquellos pacientes que han sido incluidos en el grupo de alto riesgo de recaída reciben un tratamiento más agresivo que aquellos que se catalogan en el grupo de riesgo bajo.

Los diferentes criterios empleados para estratificar los pacientes según el protocolo PETHEMA (Protocolo Español para Hemopatías Malignas)<sup>8</sup> son la edad del paciente al diagnóstico, el número de leucocitos al diagnóstico, el inmunofenotipo de las células leucémicas, las alteraciones genéticas que presentan y la respuesta al tratamiento en función de la enfermedad mínima residual (EMR). Este último factor pronóstico hace referencia a la presencia de células leucémicas en aspirados de médula ósea donde no hay evidencias morfológicas de ellas. Para determinar la presencia de estas células se usan técnicas más sensibles como la citometría de flujo y la PCR cuantitativa. La EMR es un factor pronóstico muy importante puesto que permite identificar pacientes que, aun habiendo sido clasificados en el grupo de bajo riesgo, presentan una alta probabilidad de recaer en la enfermedad<sup>9</sup>.

En base a los factores pronósticos los pacientes se dividen en tres grupos de riesgo: bajo, intermedio o alto. Para que un paciente sea incluido en el grupo de riesgo alto debe cumplir al menos una de las características que se indica en la Tabla 1, mientras que los pacientes del grupo de riesgo bajo deben cumplir todos los criterios detallados.

	GRUPO DE RIESGO ALTO	GRUPO DE RIESGO BAJO
EDAD	Inferior al año	Entre 1 y 9 años
INMUNOFENOTIPO	LLA pro-B	LLA B común o pre-B
Nº LEUCOCITOS AL DIAGNÓSTICO	$> 100 \cdot 10^9/l$	$< 20 \cdot 10^9/l$
ALTERACIÓN GENÉTICA	Reordenamiento MLL t(9;11) o t(4;11) t(9;22) BCR-ABL1	Ausencia de hipodiploidía reordenamiento MLL t(9;22) BCR-ABL1
RESPUESTA AL TRATAMIENTO	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Blastos en aspirado de MO <math>&gt; 5\%</math> a día 14 y fenotipo T o Nº leucocitos <math>&gt; 100 \cdot 10^9/l</math></li> <li>· Blastos en aspirado de MO <math>&gt; 20\%</math> a día 14</li> <li>· Blastos en aspirado de MO <math>\geq 5\%</math> a las 5 semanas</li> <li>· EMR <math>\geq 1\%</math> en MO a las 5 semanas</li> <li>· EMR <math>\geq 0,1\%</math> en pacientes RB o RI a la semana de iniciarse el tratamiento de consolidación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Nº de leucocitos en sangre <math>&lt; 1 \cdot 10^9/l</math> a día 8</li> <li>· Blastos en aspirado de MO <math>&lt; 20\%</math> a día 14</li> <li>· Blastos en aspirado de MO <math>&lt; 5\%</math> y EMR <math>&lt; 1\%</math> a día 35</li> </ul>

**Tabla 1: Criterios empleados para la clasificación de los pacientes en los diferentes grupos de riesgo, según el Protocolo Español para Hemopatías Malignas (PETHEMA).** LLA, leucemia linfoblástica aguda; MO, médula ósea; EMR, enfermedad mínima residual.

#### 1.4. Recaída en la enfermedad.

Las recaídas en la LLA constituyen la quinta enfermedad hematológica más común en niños. Suelen ocurrir en diferentes localizaciones, siendo las extramedulares (sistema nervioso central, testículos) de mejor pronóstico que las que ocurren de nuevo en médula ósea <sup>10</sup>.

El estudio de muestras de pacientes en el momento del diagnóstico y en la recaída de la enfermedad indica que, bien el clon leucémico ya estaba presente al diagnóstico aunque en menor proporción, o bien surge a causa de nuevas mutaciones durante el tratamiento. En este sentido, la quimioterapia eliminaría el clon dominante detectado al diagnóstico permitiendo el desarrollo del otro clon más resistente, pero además podría ser responsable de la adquisición de nuevas mutaciones que afectarían principalmente a genes reguladores del ciclo celular y del desarrollo linfoide, así como a otros responsables de la resistencia al tratamiento <sup>11-13</sup>.

Así, a pesar de la estratificación de los pacientes en los distintos grupos de riesgo en el momento del diagnóstico, un porcentaje importante de los que se incluyen en el grupo de riesgo bajo siguen recayendo. Es el caso del 20% de los pacientes con la translocación TEL-AML1 de buen pronóstico, si bien estas recaídas suelen ser tardías, lo que se considera un factor favorable <sup>10, 14</sup>. Por ello se hacen necesarios nuevos estudios que permitan clasificar de forma correcta a estos pacientes. Esta nueva estratificación tras la recaída se basa en el tiempo en que esta ocurre desde el diagnóstico, su localización y el inmunofenotipo de las células leucémicas, permitiendo administrar un tratamiento más intenso para combatir el nuevo clon leucémico. Generalmente este tratamiento incluye una intensificación en la quimioterapia acompañada de trasplante de médula ósea o de otras terapias como la infusión de células NK <sup>10</sup>.

#### 1.5. Tratamiento de la enfermedad.

El tratamiento de la enfermedad difiere entre los distintos grupos de riesgo en cuanto a su duración y número de fármacos administrados, siendo menos intenso en los pacientes catalogados de riesgo bajo respecto a los de riesgo alto. En todos ellos el tratamiento se

divide en las mismas fases. Una primera fase de inducción en la que se busca eliminar el clon leucémico dominante y restaurar la hematopoiesis; una segunda fase de intensificación/consolidación para eliminar las células residuales; y una última fase de mantenimiento de dos años de duración. En el caso de pacientes de riesgo alto de recaída, se incluyen además fases de reinducción con diferentes fármacos. En general el tiempo de tratamiento es de 24 meses, periodo durante el cual se realizan aspirados de médula ósea al inicio de cada ciclo quimioterápico y cada seis meses durante la etapa de mantenimiento <sup>2, 8</sup>.

Para la profilaxis del sistema nervioso central se llevan a cabo desde el principio del tratamiento, punciones lumbares repetidas con quimioterapia intratecal, mejorando notablemente la supervivencia y reduciendo los efectos secundarios derivados de otros tratamientos como la radiación <sup>2, 8</sup>.

En casos con muy elevado riesgo de recaída o recaídas recurrentes se lleva a cabo, como hemos indicado anteriormente, el trasplante de médula ósea combinado con quimioterapia. Sin embargo, dada la gran variabilidad en la respuesta, son necesarios estudios adicionales para determinar su efectividad y los grupos de pacientes a los que dirigir este abordaje terapéutico <sup>15</sup>. Asimismo, actualmente están en marcha numerosos ensayos clínicos con terapias alternativas, con el fin de mejorar la supervivencia de los pacientes de LLA hasta alcanzar el 100% y reducir los efectos secundarios de los tratamientos actuales <sup>16</sup>. Estas terapias incluyen la infusión con linfocitos T y células NK modificados genéticamente, así como el tratamiento con anticuerpos monoclonales o con agentes epigenéticos y están mostrando una gran efectividad para el tratamiento de la enfermedad <sup>17-21</sup>.

## 2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES: UN COMPONENTE FUNDAMENTAL DEL NICHOS HEMATOPOYÉTICO.

### 2.1. Características del nicho hematopoyético.

Para poder comprender mejor el desarrollo y progresión de las enfermedades hematológicas no basta con conocer los cambios moleculares que acompañan a la transformación maligna de los diferentes progenitores hematopoyéticos. Así, los estudios más recientes se han centrado en conocer la implicación del microambiente medular en el desarrollo y progresión de la enfermedad, al ser éste el lugar donde las células leucémicas se asientan y proliferan.

Algunos de estos trabajos han descrito cómo deficiencias en el receptor del ácido retinoico, la delección de Dicer1 o la expresión forzada de  $\beta$ -catenina en diferentes componentes del nicho parecen ser suficientes para inducir un síndrome mielodisplásico o un proceso de leucemogénesis<sup>22-24</sup>. Arranz y colaboradores demostraron que la eliminación de la inervación simpática reducía el número de células madre mesenquimales (MSCs) Nestina<sup>+</sup> provocando la expansión de los progenitores hematopoyéticos y la progresión de neoplasmas mieloproliferativos<sup>25</sup>. Además recientemente, el grupo de Trumpp utilizando un modelo de ratón humanizado, demostraron que células primarias de pacientes con síndrome mielodisplásico reprograman las MSCs creando una unidad funcional recíproca blasto-estroma capaz de iniciar y propagar la patología hematológica<sup>26</sup>. Por lo tanto, parece claro que el comportamiento del estroma medular puede resultar clave en la iniciación y evolución de la enfermedad<sup>27,28</sup>.

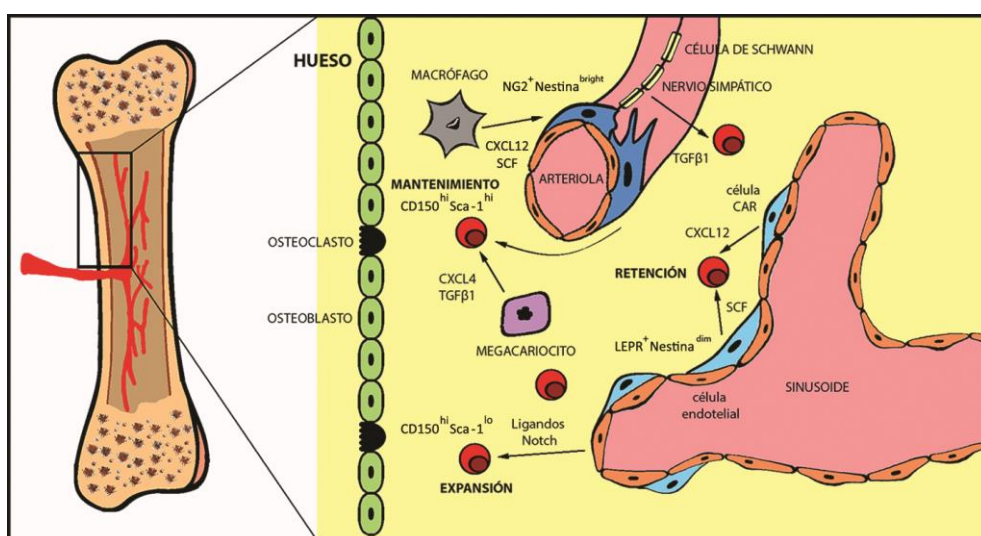
El microambiente medular está formado por componentes celulares y no celulares que, en condiciones normales, contribuyen al mantenimiento de la homeostasis hematopoyética, manteniendo un equilibrio entre la capacidad de renovación de las células madre hematopoyéticas (HSCs), su diferenciación y quiescencia. La pérdida de este equilibrio contribuye a la progresión hacia una enfermedad hematológica. Este microambiente medular es lo que Schofield denominó nicho medular, haciendo referencia a la necesidad de la presencia de otros componentes en la médula ósea implicados en el mantenimiento de la homeostasis de los progenitores<sup>29</sup>.

El nicho medular presenta dos compartimentos que interaccionan y cooperan entre sí en el mantenimiento de la homeostasis de las HSCs, los nichos osteoblástico y vascular. Durante muchos años se pensaba que dichos compartimentos se encontraban físicamente separados, ejerciendo cada uno de ellos funciones específicas. Sin embargo, gracias al desarrollo de nuevas técnicas de microscopía e imagen se ha podido comprobar la distribución e interacción de todos los componentes del nicho formando una única unidad reguladora encargada de controlar la hematopoyesis<sup>30-32</sup> (Figura 3). Entre los componentes celulares que constituyen el llamado nicho osteoblástico se encuentran los osteoblastos. Durante años se consideró a estas células como las encargadas del mantenimiento de HSCs quiescentes, mediante la producción de diferentes factores como angiopoietina 1<sup>33</sup> o la expresión del ligando de la vía Notch, Jagged 1<sup>34, 35</sup>, la activación de la vía de señalización BMP2/4 a través del receptor BMPRIA<sup>36</sup> o la vía Wnt no canónica a través de Frizzled 8 y Flamingo<sup>37</sup>. Sin embargo, estudios recientes no muestran una clara asociación entre los osteoblastos y los progenitores hematopoyéticos, de manera que los primeros no contribuirían de manera directa al mantenimiento de las HSCs, sino que jugarían un papel en la diferenciación de células B como sugieren los resultados obtenidos en ratones knockout condicionales *Osterix-cre* y *Col2.3-cre*<sup>32, 38, 39</sup>. De esta forma, es posible que la región endosteal represente un microambiente óptimo para el mantenimiento de los progenitores linfoides donde los osteoblastos jugarían un papel central como lo hacen los macrófagos en el nicho eritroblástico<sup>32, 40</sup>. Además de los osteoblastos, en el nicho endosteal están presentes otros tipos celulares como los osteoclastos y las células osteoprogenitoras. Serían precisamente estas últimas, según estudios recientes, las que tendrían un papel central en la función de nicho para los progenitores hematopoyéticos.

En relación con el nicho vascular, los últimos estudios apuntan a que sería la vasculatura de la médula ósea próxima al endostio, la que ejercería un papel clave en el mantenimiento de los progenitores hematopoyéticos. Como se muestra en la Figura 3, cerca del endostio se pueden encontrar arteriolas y sinusoides vasculares, constituidos por diferentes componentes celulares, encargados selectivamente del mantenimiento de la quiescencia de los progenitores hematopoyéticos CD150<sup>hi</sup>Sca-1<sup>hi</sup> o de la proliferación y diferenciación de los mismos, ahora ya con un fenotipo CD150<sup>hi</sup>Sca-1<sup>lo</sup><sup>41</sup> (Figura 3). Células periarteriolas NG2<sup>+</sup>Nestina<sup>bright</sup> con morfología de pericito y productoras de SCF y CXCL12 serían los



principales responsables del mantenimiento de la quiescencia de las HSCs. En este nicho además, células endoteliales, células de Schwann y fibras nerviosas simpáticas, contribuirían al mantenimiento de la quiescencia controlando, entre otros, la movilización de los progenitores <sup>42</sup>. Por el contrario, en nichos perisinusoidales, más alejados del endostio, las células perivasculares  $LEPR^+Nestina^{dim}$  de morfología reticular y que incluyen entre otras a las células madre mesenquimales, favorecerían la entrada de las HSCs en el ciclo celular para su proliferación y diferenciación <sup>32</sup>. Owen y Friedenstein ya predijeron que la progresión en el programa genético de diferenciación del componente estromático de la médula ósea era tan compleja como la del componente hematopoyético <sup>43</sup>. 25 años después y, a pesar de los avances recientes utilizando combinaciones de diferentes modelos genéticos, aún estamos lejos de conocer la organización jerárquica de todas estas células estromales de la médula ósea.



**Figura 3: Componentes del nicho medular.** Progenitores hematopoyéticos quiescentes  $CD150^{hi}Sca-1^{hi}$  se localizan en las proximidades de las arteriolas donde las células  $NG2^+Nestina^{bright}$  junto con células endoteliales, células de Schwann y fibras nerviosas simpáticas permiten su mantenimiento. Progenitores activados  $CD150^{hi}Sca-1^{lo}$  se encuentran próximos a la región perisinusoidal donde células  $LEPR^+Nestina^{dim}$  favorecen su entrada en el ciclo celular (Modificado de Boulais y Frenette, 2015).

Así, el nicho medular está formado por diferentes células estromales que van a interaccionar entre sí y con las HSCs, mediante contactos célula-célula o a través de la producción de diferentes factores, para regular la hematopoyesis. La alteración en alguno

de los componentes, llevaría a un desequilibrio de la hematopoyesis y, en consecuencia, al desarrollo de enfermedad.

## 2.2. Características de las células madre mesenquimales.

Como se ha mencionado anteriormente, las MSCs son uno de los principales componentes del nicho medular, implicadas en el mantenimiento y regulación de la hematopoyesis<sup>44</sup>. El término célula madre mesenquimal fue propuesto por Caplan en 1991<sup>45</sup> para hacer referencia a la población de células adherentes con capacidad para generar unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F) y para diferenciarse a osteoblastos, que habían descrito Owen y Friedenstein años atrás en médula ósea de cobaya<sup>43</sup>. Posteriormente diferentes grupos de investigación comprobaron que esta misma población heterogénea de células podía aislarse de otros tejidos como músculo esquelético<sup>46</sup>, cordón umbilical<sup>47</sup>, timo<sup>48</sup>, líquido amniótico, placenta<sup>49</sup>, tejido adiposo<sup>50</sup> o tejido nervioso<sup>51</sup>. Independientemente de su origen, estas células en realidad son una entidad celular *in vitro* cuya equivalencia *in vivo* parecen ser células adherentes de la región perivascular del nicho<sup>42</sup>. La gran cantidad de estudios que se desarrollaron a raíz de su descubrimiento, empleando células de origen distinto y métodos experimentales de aislamiento diferentes, dieron lugar a resultados contradictorios en cuanto a las características de estas células. Fue por ello que, en 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) estableció una serie de criterios mínimos que debían cumplir estas células. Así, independientemente de su origen, que parece conllevar diferencias en cuanto a su capacidad de proliferación y diferenciación<sup>52, 53</sup>, todas ellas debían presentar una morfología fibroblastoide, con capacidad para adherirse al plástico. Debían tener un fenotipo caracterizado por la presencia, en al menos un 95% de la población, de marcadores poco específicos como CD29, CD73, CD90 o CD105, y la ausencia de otros marcadores hematopoyéticos como CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45 o HLA-II; y debían ser capaces de diferenciar a tres tipos celulares de origen mesodérmico: adipocitos, osteoblastos y condroblastos<sup>54</sup>. Más tarde se confirmaría su capacidad para transdiferenciar a otras células de origen ectodérmico y endodérmico, incluyendo células endoteliales, cardiomiocitos, hepatocitos o neuronas<sup>55-59</sup>.

### 2.3. Función inmunomoduladora de las células madre mesenquimales.

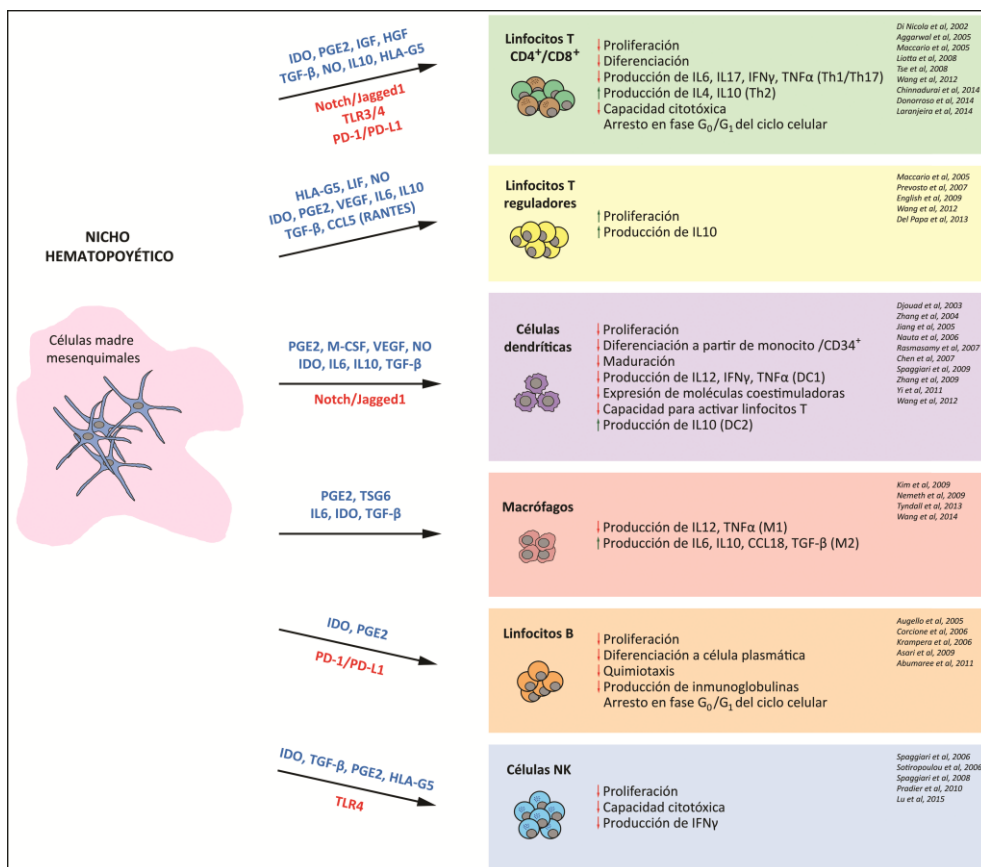
Una característica principal de estas células es su capacidad inmunomoduladora, lo que junto a su capacidad de diferenciación a distintos tipos celulares ha hecho que sean consideradas como una herramienta muy útil en clínica.

Diferentes trabajos han confirmado la capacidad de estas células para inhibir la función de las células del sistema inmunitario tanto innato como adaptativo <sup>60</sup>. Dicho efecto estaría mediado por la producción de diferentes factores solubles como TGF- $\beta$ 1, PGE2 o HGF <sup>60, 61</sup> y por interacciones célula-célula entre las que destacan la vía de señalización Notch o la activación de la vía PD-1/PD-L1 <sup>62-65</sup>.

El cómo se desencadena este efecto requiere aún mayor investigación, aunque estudios recientes indican una dependencia de la presencia de citoquinas proinflamatorias en el microambiente, principalmente de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  <sup>66, 67</sup>. Dichas citoquinas inducen la expresión de MHC-II en la superficie de las MSCs <sup>60</sup> y activan la vía de señalización NF- $\kappa$ B <sup>66</sup>, además de regular la producción de otros factores como IL8 (CXCL8), CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), PGE2, IL6 o VEGF <sup>67</sup>.

Las MSCs pueden modular la función de las principales poblaciones celulares del sistema inmunitario incluyendo linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos y células NK (Figura 4).

Las MSCs aisladas tanto de médula ósea como de otros tejidos, son capaces de reducir significativamente la proliferación de los linfocitos T, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, de una manera dosis-dependiente <sup>61</sup>. Sin embargo, este efecto no sólo compromete su proliferación, sino también su capacidad de diferenciación, capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y producción de citoquinas <sup>68, 69</sup>. La presencia de las MSCs en el cultivo reduce la producción de IFN $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y potencia la de IL10. Incrementa además la producción de otros factores antiinflamatorios como IL4 y reduce la de las citocinas proinflamatorias TNF $\alpha$  e IL6 <sup>70</sup>. Estos cambios, junto a su capacidad para inducir la generación de linfocitos T reguladores <sup>63, 69, 71</sup>, serían responsables de su acción inmunosupresora.



**Figura 4: Efectos inmunomoduladores de las MSCs sobre las diferentes poblaciones de células del sistema inmunitario.** Las MSCs que se encuentran en el nicho hematopoyético producen factores solubles (azul) y establecen interacciones célula-célula (rojo) con los que modulan la respuesta de las células del sistema inmunitario. Reducen la proliferación y función de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , linfocitos B, células NK y células dendríticas; mientras que estimulan la de linfocitos T reguladores. Además, inducen la producción de factores solubles que llevan a una respuesta inmunitaria del tipo Th2, bloqueando la respuesta Th1.

También ejercen un efecto inmunosupresor sobre la población de células dendríticas, principales células presentadoras de antígeno, capaces de activar linfocitos T  $CD4^+$  naïve. En este sentido, se ha demostrado la capacidad de las MSCs para inhibir la diferenciación y maduración de las células dendríticas a partir de células  $CD34^+$  o de monocitos, dando lugar a células dendríticas inmaduras incapaces de llevar a cabo la activación de los linfocitos T<sup>72-75</sup>. La presencia de las MSCs en los cultivos reduce la capacidad de las células dendríticas de producir IL12, comprometiendo la estimulación de los linfocitos T. Diferentes moléculas solubles han sido propuestas como mediadores de este efecto inmunosupresor, entre ellas se incluyen M-CSF, IL-6 y principalmente PGE2<sup>73, 75</sup>.

Los estudios relativos a la función de las MSCs sobre los macrófagos son muy escasos, a pesar de la importancia de estas células en el mantenimiento de la homeostasis tisular y defensa frente a infecciones. Los macrófagos, componentes de la inmunidad innata, pueden clasificarse en dos grupos en función de la respuesta inmunitaria que lleven a cabo. Se diferencian así en macrófagos de tipo M1, principalmente proinflamatorios y macrófagos M2, antiinflamatorios. La presencia de MSCs, aisladas tanto de humano como de ratón, induce la diferenciación de monocitos hacia macrófagos con un fenotipo similar a M2, que producen bajos niveles de TNF $\alpha$  e IL12 al tiempo que incrementan la secreción de IL10<sup>76, 77</sup>.

Respecto a su capacidad inmunomoduladora sobre los linfocitos B, los estudios publicados son muy escasos y generalmente contradictorios dada la gran variabilidad de condiciones experimentales empleadas. En este sentido, Corcione y colaboradores<sup>78</sup> concluyeron que las MSCs reducen la proliferación de los linfocitos B, mediante arresto en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular, además de inhibir su diferenciación a célula plasmática, su capacidad de producción de inmunoglobulinas y quimiotaxis. Dicha reducción estaría mediada tanto por la producción de los factores solubles IDO y PGE2 como por la activación del eje PD1-PDLs<sup>62, 79</sup>. Esto ha permitido comenzar a hacer estudios del potencial terapéutico de estas células en el contexto de algunas enfermedades autoinmunes.

El impacto inmunomodulador de las MSCs sobre la población de células NK será comentado posteriormente.

En contraste a todo lo descrito anteriormente, es necesario hacer referencia a estudios recientes que indican que las propiedades inmunomoduladoras de estas células serían mucho más complejas, siendo capaces tanto de activar como de inhibir el sistema inmunitario. En este sentido, los resultados obtenidos por Waterman y colaboradores sugieren que las MSCs, al igual que otras células del sistema inmunitario como los macrófagos o los neutrófilos, pueden polarizar a dos fenotipos diferentes, MSC1 proinflamatorio o MSC2 antiinflamatorio, en función de las señales que reciben del microambiente en que se encuentren. Esta polarización depende entre otros, de la activación de los receptores TLR3 y TLR4, que van a inducir cambios en su capacidad de diferenciación, migración, producción de diferentes citoquinas e interacción con poblaciones celulares como los linfocitos T<sup>80, 81</sup>. En el contexto del cáncer, diferentes

grupos han descrito a las MSCs como células promotoras del crecimiento tumoral, mientras que otros hablan de su capacidad para reducirlo. Estas diferencias en su función dependerían del fenotipo predominante dentro de la población total de MSCs presente o que alcanza el tumor, donde las MSC2 favorecerían el crecimiento del tumor mientras que las MSC1 lo bloquearían<sup>81, 82</sup>.

#### **2.4. Células madre mesenquimales en terapia celular.**

Gracias a las propiedades inmunomoduladoras descritas, así como a su fácil aislamiento y expansión *ex vivo*, su capacidad de diferenciación y transdiferenciación y su capacidad para migrar a las zonas de daño tisular, las MSCs se han convertido en una herramienta muy útil para su aplicación en clínica. En la actualidad se están desarrollando aproximadamente unos 500 ensayos clínicos, la mayor parte en fases I/II, para el uso de estas células en la terapia de diferentes enfermedades como la enfermedad injerto contra huésped (EICH)<sup>83, 84</sup>, enfermedades autoinmunes<sup>85, 86</sup>, enfermedades neurológicas<sup>87</sup>, enfermedades óseas<sup>88, 89</sup>, trasplantes<sup>90</sup> y enfermedades cardiovasculares<sup>91</sup>. Su aplicación en terapia oncológica también está siendo estudiada dado su posible uso como vehículo terapéutico. Actualmente la terapia anticancerígena se basa en la administración de quimioterapia y radioterapia, combinada con nuevos agentes como anticuerpos monoclonales y vectores virales. Estas nuevas terapias, que resultan más efectivas y presentan menos efectos adversos que las drogas quimioterápicas, están presentado diversos problemas derivados de su corta vida media en circulación, su dificultad para alcanzar la zona de crecimiento tumoral y la respuesta inmunitaria del propio organismo contra ellas. Es por ello que cobra especial importancia el desarrollo de vehículos terapéuticos capaces de portar dichos vectores y anticuerpos hasta las regiones de crecimiento tumoral, evitando su extravasación a otros tejidos y la acción del sistema inmunitario del organismo. Apoyándose en el tropismo de las MSCs al tumor, en los últimos años se han publicado ya trabajos referentes al uso de las MSCs como vehículos de virus, drogas citotóxicas o citocinas contra células tumorales<sup>92-94</sup>. Es fundamental completar estos estudios con nuevas investigaciones que clarifiquen el comportamiento de las MSCs sobre el crecimiento tumoral y desarrollar estrategias encaminadas a modificar su fenotipo inmunosupresor hacia un fenotipo MSC1 antitumoral<sup>82</sup>.

## 2.5. Células madre mesenquimales en las enfermedades hematológicas.

Como se ha mencionado anteriormente el nicho hematopoyético, y más concretamente las MSCs, han sido objeto de estudio de múltiples trabajos dada su más que posible implicación en el desarrollo de enfermedades hematopoyéticas. En algunos de estos trabajos se ha confirmado la existencia de alteraciones genéticas en estas células, que bien podrían ser causa o consecuencia del desarrollo del clon preleucémico <sup>23, 95</sup>. En este sentido, resultan especialmente interesantes los resultados obtenidos por Menéndez y colaboradores que encontraron la misma traslocación genética en blastos de LLA infantil y en células del estroma de los mismos pacientes, sugiriendo un origen común de ambas poblaciones <sup>96</sup>.

Por otro lado, distintos trabajos han confirmado diferencias de las MSCs de los pacientes en cuanto a su fenotipo, capacidad de proliferación y diferenciación y producción de citoquinas <sup>23, 27, 95, 97-107</sup>. Así, se ha observado una menor capacidad proliferativa de las MSCs aisladas tanto de pacientes con síndrome mielodisplásico <sup>100, 103, 106</sup> como de mieloma múltiple <sup>98</sup> y de leucemia linfoblástica aguda <sup>101</sup>. En el caso de la leucemia mieloide aguda, los resultados encontrados son contradictorios, habiéndose observado en un caso una reducción de la proliferación <sup>107</sup> mientras que en otro no se han encontrado alteraciones en comparación con MSCs de donantes sanos <sup>105</sup>.

Respecto a su capacidad de diferenciación, los mayores cambios se han encontrado en su capacidad de diferenciación osteogénica, que se ha visto reducida en MSCs aisladas de pacientes con leucemia mieloide aguda <sup>105</sup>, síndrome mielodisplásico <sup>100, 103, 106</sup> y mieloma múltiple <sup>98</sup>. Por el contrario, en pacientes pediátricos de leucemia linfoblástica aguda y de síndrome mielodisplásico no se han observado esas mismas alteraciones, de ahí, entre otras cosas, que se considere una enfermedad diferente respecto a la de pacientes en edad adulta <sup>101, 108</sup>. En el caso de desórdenes de origen mieloide, estas diferencias se han asociado a la ausencia de Dicer1 en las MSCs, lo que comprometería su capacidad de proliferación, diferenciación osteogénica e induciría su senescencia <sup>23, 106</sup>.

Igualmente se han observado alteraciones en la producción por las MSCs de diferentes citoquinas y quimioquinas, como es el aumento de IL6 en mieloma múltiple <sup>97, 109</sup> y en síndrome mielodisplásico <sup>108</sup> y que ha sido implicada en el crecimiento tumoral y la resistencia a terapia. Asimismo, cambios en la producción de las quimioquinas CCL2 (MCP-

1) e IL8 (CXCL8) se han descrito principalmente en leucemia y su incremento también se ha considerado como un factor de mal pronóstico en muchas de ellas<sup>102, 105</sup>.

Además se han observado alteraciones en las vías de señalización Jagged1/Notch y CXCL12/CXCR4 en MSCs derivadas de pacientes de leucemia mieloide aguda<sup>27</sup>, y en aquellas de pacientes de leucemia mieloide crónica se ha observado una mayor producción de la metaloproteasa MMP9 que favorecería la degradación de la matriz extracelular y la progresión de la enfermedad<sup>99</sup>.

Resultan mucho más escasos los estudios centrados en conocer las posibles diferencias en su capacidad inmunomoduladora. La mayor parte de los trabajos presentes en la literatura se han centrado en conocer su capacidad inmunosupresora sobre linfocitos T, dejando de lado el resto de poblaciones celulares del sistema inmunitario. Si bien en el caso de las MSCs aisladas de pacientes de leucemia linfoblástica aguda, se ha descrito una capacidad inmunomoduladora sobre PBMCs similar a aquella exhibida por MSCs procedentes de donantes sanos<sup>101</sup>, los grupos de Arnulf y de Xishan demostraron que las MSCs derivadas de pacientes con mieloma múltiple o leucemia mieloide crónica<sup>97, 99</sup> carecían de esta capacidad inmunosupresora característica. En cualquier caso, estas alteraciones se han interpretado como cambios llevados a cabo por las células tumorales para favorecer el desarrollo del tumor, en lugar de un mecanismo activado por el organismo para frenar dicho crecimiento.

Desde el pasado año, algunos trabajos sugieren ya un comportamiento diferencial de las MSCs aisladas de pacientes con enfermedades hematológicas con bajo riesgo de recaída respecto a aquellos de riesgo elevado. En estos estudios realizados principalmente en enfermedades de origen mieloide, se ha observado una menor capacidad de proliferación, diferenciación osteogénica y supervivencia así como una producción diferencial de angiopoietina-1, TGF- $\beta$  y HGF en MSCs aisladas de pacientes con riesgo bajo de recaída en la enfermedad<sup>104, 110</sup>. Por otra parte y en relación a estos resultados, Wang y colaboradores observaron un diferente comportamiento inmunomodulador sobre células dendríticas entre las MSCs aisladas de pacientes con síndrome mielodisplásico en función del riesgo de recaída<sup>111</sup>. En conjunto, estos resultados sugieren que la caracterización inmunomoduladora de las MSCs de los pacientes en el momento del diagnóstico de la



enfermedad podría ser de gran importancia en la progresión de ésta pudiendo ser otro parámetro más a considerar como factor pronóstico de la enfermedad.

### 3. CÉLULAS NK.

#### 3.1. Características de las células NK.

Las células NK fueron descritas por primera vez en 1975, cuando Herberman y colaboradores identificaron una población de células, tanto en humano como en ratón, con capacidad para eliminar células tumorales sin activación previa, a la que denominaron células asesinas naturales o *natural killer cells*<sup>112-114</sup>.

Estas células, integradas dentro de la familia de células linfoides innatas (ILCs)<sup>115</sup>, constituyen una población de linfocitos con capacidad para lisar células transformadas o infectadas por virus de manera directa. Además, son también productoras de diferentes citoquinas relevantes tanto para la respuesta inflamatoria como en la interacción que establecen con otros tipos celulares del sistema inmunitario, principalmente células dendríticas y linfocitos T CD4<sup>+</sup><sup>116-118</sup>. Estas características funcionales, junto a la recientemente demostrada capacidad para llevar a cabo una respuesta más rápida y efectiva frente a infecciones secundarias, así como su expansión clonal y prolongada, han hecho que las células NK sean consideradas una población celular tanto de la inmunidad innata como adaptativa<sup>119, 120</sup>.

En humano, las células NK vienen definidas por la ausencia del marcador de linfocitos T CD3 y la presencia de los marcadores CD56 y NKp46<sup>121, 122</sup>. En base a estos marcadores, históricamente se han diferenciado dos subpoblaciones: la subpoblación CD56<sup>bright</sup>, con mayores niveles de expresión de este marcador; y la subpoblación CD56<sup>dim</sup>, en las que la expresión del antígeno es menor y expresan además el receptor CD16<sup>122-125</sup>. Junto a estas diferencias fenotípicas, presentan otras relativas a su función y localización. Así, las células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, con función principalmente citotóxica, se encuentran en sangre periférica, donde permanecen recirculando de manera continua hasta que, ante una señal determinada del microambiente, migran al lugar de la inflamación dirigidas por diferentes quimioquinas<sup>116, 117</sup>. Por otro lado, las células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>, que constituyen solo un 10% de las células NK presentes en el torrente sanguíneo, abundan en ganglios linfáticos y en órganos no linfoides como hígado, pulmón, bazo, páncreas y útero<sup>126</sup>. Aunque presentan pequeñas diferencias funcionales en cuanto a su localización, estas células se caracterizan por su capacidad para producir niveles elevados de diferentes citoquinas proinflamatorias

como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , y quimioquinas, que contribuyen a la activación de células de la inmunidad adaptativa antes mencionadas<sup>116, 117, 122, 124, 127</sup>. Estudios recientes indican sin embargo que ambas funciones, capacidad citotóxica y producción de citocinas, no son exclusivas de las subpoblaciones de células NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> respectivamente, sino que ambas subpoblaciones pueden llevar a cabo funciones citolíticas y funciones inmunomoduladoras pero con diferente efectividad<sup>128, 129</sup>.

Al igual que el resto de células hematopoyéticas, las células NK se diferencian en la médula ósea a partir de progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup>, pudiendo transcurrir algunas etapas de este proceso en localizaciones extramedulares como amígdala y ganglios linfáticos<sup>130, 131</sup>. Durante su diferenciación, estas células van adquiriendo un amplio repertorio de receptores activadores e inhibidores que les harán inmunocompetentes al tiempo que bloquean su capacidad autorreactiva. Los mecanismos que median este proceso conocido como educación o *licensing* aún no se conocen con certeza, si bien parece desempeñar un papel clave la interacción de los receptores inhibidores pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (KIRs) con moléculas MHC-I propias<sup>132, 133</sup>.

Junto a estos receptores inhibidores KIRs, que reconocen los antígenos leucocitarios humanos de clase I, HLA-A, -B, -C, se encuentra el receptor heteromérico CD94/NKG2A de la familia de las C-lectinas, cuya activación depende del reconocimiento de la molécula HLA no clásica, HLA-E. Ambos poseen en el dominio citoplasmático motivos ITIM (motivos de inhibición de inmunorreceptores basados en tirosina) que fosforilan las proteínas tirosín quinasas SHP-1 y SHP-2 e inhiben la actividad citotóxica<sup>134-136</sup>. Esta señal inhibidora permite a las células NK bloquear su actividad lítica frente a células sanas, mediante el reconocimiento de las moléculas MHC-I que estas presentan en su superficie.

Expresan además un amplio repertorio de receptores de activación, encargados de la transducción de señales necesarias para la lisis de las células diana y la producción de citoquinas. En humano, los receptores de activación más destacados son el receptor CD16, responsable de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), los receptores citotóxicos naturales (NCRs) NKp30, NKp44 y NKp46, el heterodímero CD94/NKG2D y los receptores activadores KIR2DS y KIR3DS. Todos ellos, a excepción del receptor NKG2D, interaccionan con las proteínas de señalización DAP12, FcR $\gamma$  o CD3 $\zeta$ , que contienen motivos

ITAM (motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina) que transmiten una señal activadora. La fosforilación de dichos motivos conlleva el reclutamiento de las proteínas tirosín-quinasa Syk y ZAP70, necesarias tanto para la actividad citotóxica como para la producción de citoquinas. Por su parte, el receptor NKG2D se asocia al adaptador DAP10, independiente de motivos ITAM, y señala a través de Grb2, PLC $\gamma$ 2, SLP76 y PI3K<sup>135, 136</sup>. Los ligandos para estos receptores son diversas moléculas cuya expresión se ve incrementada en condiciones de estrés celular como infección, daño tisular o transformación tumoral<sup>125, 130</sup>. Así, el receptor NKG2D reconoce como ligandos las moléculas MHC-I no clásicas MICA y MICB, y las proteínas de unión a UL16, ULBP1-4<sup>137</sup>, cuya expresión se encuentra incrementada en algunos tumores<sup>138-141</sup>. Los ligandos de los NCRs incluyen hemaglutininas y otros antígenos virales además de proteínas asociadas al shock térmico o a diferentes antígenos tumorales. Entre estos ligandos destaca la proteína B7H6, miembro de la familia B7, que interacciona con el receptor Nkp30 y que únicamente se expresa en células tumorales, correlacionando en algunos casos con el pronóstico de la enfermedad<sup>142-144</sup>. Finalmente, los receptores KIR activadores KIR2DS y KIR3DS reconocen, al igual que los inhibidores, moléculas HLA clásicas y no clásicas. Estos receptores son muy importantes en la eliminación de células transformadas, especialmente en aquellos tumores donde no hay una reducción en la expresión de dichos ligandos<sup>145</sup>.

Otros receptores y correceptores responsables de la activación de las células NK son DNAM-1, Nkp80 y 2B4<sup>146-148</sup>.

La actividad de las células NK va a depender de la recepción de señales inhibitoras y activadoras provenientes del microambiente en que se encuentren, estableciendo un equilibrio entre ambas, responsable del mantenimiento de su homeostasis. En condiciones normales, estas células permanecen inactivas gracias al predominio de las señales inhibitoras encargadas de controlar la respuesta al estímulo. Las células infectadas por virus y las células tumorales pueden perder la expresión de moléculas MHC-I al tiempo que regulan positivamente la expresión de ligandos para los receptores activadores modificando el balance de señales activadoras/inhibidoras y desencadenando entonces la activación de las células NK, que conlleva la producción de citoquinas y otros factores así como la lisis de la célula diana<sup>119</sup>.

La citotoxicidad es un proceso altamente regulado que requiere del contacto directo entre las células NK y las células diana, dando lugar a una estructura tridimensional muy compleja y dinámica conocida como sinapsis inmunológica. La formación de esta sinapsis transcurre en varias etapas que van desde el reconocimiento y adhesión a la célula diana, hasta la liberación de los gránulos citotóxicos que contienen perforina, granzima y granulolisina en el citoplasma de estas. Ante la señal adecuada, la perforina induce la formación de poros en la membrana de las células diana, permitiendo la entrada de las serín-proteasas granzima y perforina, responsables de inducir la muerte celular mediante mecanismos dependientes e independientes de caspasas<sup>149-151</sup>. La célula NK también puede reconocer a la célula diana a través del receptor Fc CD16 que se une a la región constante de las inmunoglobulinas presentes en la membrana de esta, desencadenando en este caso un proceso de citotoxicidad dependiente de anticuerpo<sup>152</sup>. De manera alternativa, la muerte de las células diana puede estar mediada también a través de los receptores de muerte celular pertenecientes a la familia de TNF<sup>153-155</sup>. Entre ellos destaca FasL, importante en la homeostasis de linfocitos T<sup>155</sup>, y TRAIL, con función inmunosupresora e inmunoreguladora<sup>154</sup>.

En relación a la producción de factores solubles, las células NK activadas producen fundamentalmente IFN $\gamma$ , pero también producen otras citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , o inmunosupresoras como IL10, factores de crecimiento como GM-CSF, G-CSF e IL3 así como diferentes quimioquinas como CCL2 (MCP1), CCL3 (MIP1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES), XCL1, o IL8 (CXCL8)<sup>156</sup>.

### 3.2. Células NK en el contexto tumoral.

En conjunto, estas propiedades exhibidas por las células NK han hecho que sean consideradas principales agentes antitumorales del organismo. Sin embargo, en muchos tumores se ha observado su incapacidad para hacer frente a la transformación maligna y el desarrollo de metástasis.

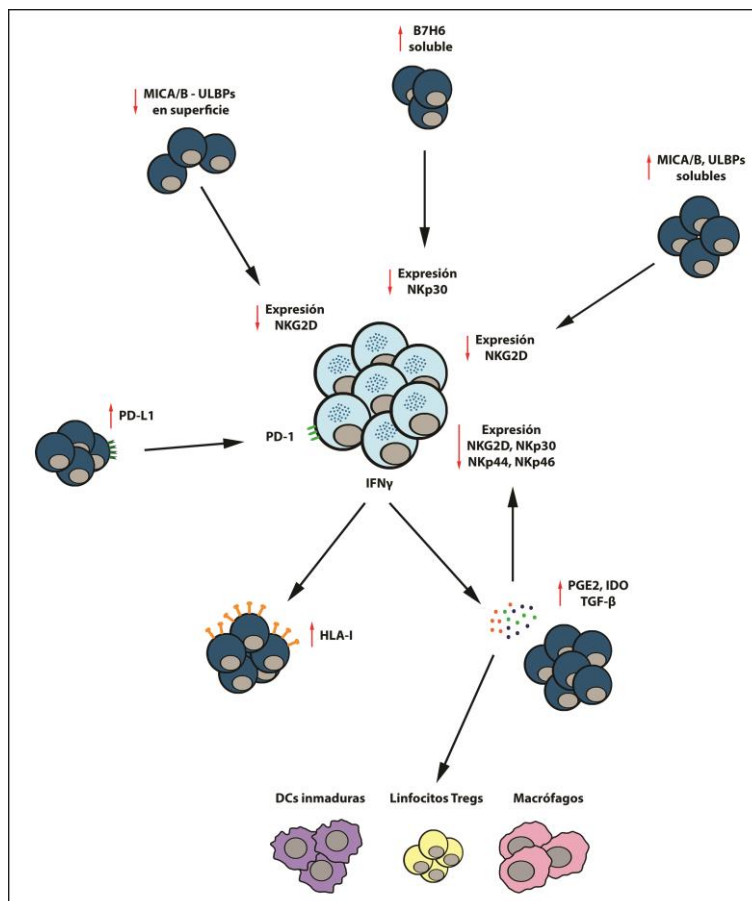
En estudios realizados tanto en tumores sólidos como hematológicos se ha observado una función comprometida de las células NK infiltradas en el tumor, en oposición a las células NK de sangre periférica que son funcionalmente competentes. Así, en ratones trasplantados con células de linfoma se observó un incremento en la expresión de los

receptores CD160, PD-1 y CTLA-4 en las células que infiltraban el tumor<sup>157</sup>. Del mismo modo, la expresión de PD-1 se encontró incrementada en células NK de pacientes con mieloma múltiple<sup>158</sup>

Esta diferencia en las células NK presentes en la zona del tumor se debe al desarrollo de diferentes estrategias que limitan la acción del sistema inmunológico<sup>159</sup> (Figura 5). La creación de un microambiente tumoral proinflamatorio por parte de las células tumorales, mediante la producción de diferentes factores y el reclutamiento de células del sistema inmunitario con función principalmente inmunosupresora, contribuye al bloqueo de la actividad de las células NK. Entre las células del sistema inmunitario presentes en este microambiente destacan los macrófagos asociados a tumor, los linfocitos T reguladores, las células dendríticas inmaduras y neutrófilos, que activan una respuesta inmunológica del tipo Th2, con la producción de factores inmunosupresores como TGF- $\beta$ 1, PGE2 e IDO, responsables de la reducción en la expresión de los receptores de activación de las células NK. En melanoma se ha observado una menor expresión de NKp30, NKp44 y NKG2D en las células NK dependiente de la presencia de IDO y PGE2<sup>160</sup>; por el contrario, en neuroblastoma el responsable de esta reducción es TGF- $\beta$ 1<sup>161</sup>. Dicha reducción, que también se ha observado en cáncer de pulmón<sup>162</sup>, cáncer de próstata<sup>163</sup>, cáncer de mama<sup>164</sup>, síndromes mielodisplásicos<sup>165</sup>, leucemia mieloide aguda<sup>166, 167</sup> o leucemia linfocítica crónica<sup>168</sup>, puede estar mediada también por la liberación al medio de los ligandos para los diferentes receptores, bien directamente o a través de exosomas<sup>169-172</sup> o por su metilación, como se ha comprobado en leucemia mieloide aguda<sup>173</sup>. Asimismo, se ha observado como las células tumorales son capaces de incrementar la expresión de moléculas HLA-I responsables de la función inhibidora de las células NK, para evadir la acción de estas<sup>174-176</sup>.

Resulta también muy importante para el desarrollo de la enfermedad el tipo de subpoblación de células NK predominante en el microambiente tumoral. En muchos tipos de cáncer, una mayor infiltración por parte de las células NK correlaciona con un mejor pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, como hemos visto, en la mayoría de los casos estas células presentan deficiencias funcionales<sup>157</sup>. Varios estudios confirman el incremento de células NK CD56<sup>bright</sup> en tumor<sup>126</sup>, si bien no se sabe con certeza si es debido a un crecimiento de esta población ya presente en el tejido o a su migración desde sangre periférica. El reclutamiento de estas células al microambiente tumoral depende de la

actividad de diferentes receptores de quimioquinas, principalmente CXCR3 y CX3CR1. Junto a ellos, recientemente Pachynski y colaboradores han identificado una nueva quimioquina denominada quemerina implicada en dicho reclutamiento<sup>177</sup>.



**Figura 5: Estrategias desarrolladas por las células tumorales para evadir la acción de las células NK.** Las células tumorales reducen la expresión en su superficie de los ligandos MICA/B y ULBPs, lo que lleva a una reducción de la función del receptor NKG2D de las células NK. Esta también se ve afectada por el incremento de los ligandos solubles. Igualmente, la presencia de B7H6 soluble, ligando para NKp30, afecta a la expresión de este. Asimismo, las células NK que infiltran el tumor incrementan la expresión del receptor PD-1. Por otro lado, el IFN $\gamma$  liberado por las células NK incrementa la expresión de HLA-I en la superficie de las células tumorales, activando la función inhibitoria de las células NK. Este IFN $\gamma$  induce además la producción de los factores solubles PGE2, IDO y TGF- $\beta$ , que reducen la expresión de los receptores activadores de las células NK y reclutan células del sistema inmunitario que llevan una respuesta del tipo Th2.

En conjunto, vemos la importancia del microambiente tumoral en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Es por ello que, en la actualidad, la terapia contra el cáncer no se centra exclusivamente en eliminar las células transformadas, sino que también busca minimizar los

efectos inmunosupresores de factores y células presentes en el nicho<sup>157</sup>. Para ello, además del desarrollo de nuevos fármacos quimioterápicos más eficaces y con menos efectos secundarios, se están desarrollando nuevas terapias para potenciar la actividad antitumoral natural del organismo. Estas técnicas, que se engloban bajo el término de inmunoterapia, buscan estimular el sistema inmunitario del organismo para hacer frente a la enfermedad.

Dentro de ellas destacan las técnicas dirigidas a potenciar la actividad antitumoral de las células NK, especialmente en enfermedades hematológicas como leucemias y mieloma múltiple, y en otros tumores metastáticos. Incluyen la administración de anticuerpos monoclonales, vacunas contra el cáncer y administración de citoquinas que buscan incrementar la actividad de las células NK endógenas o exógenas tras trasplante hematopoyético<sup>157</sup>.

En la actualidad, son numerosos los ensayos clínicos destinados a conocer los efectos en el tratamiento con estas terapias en pacientes con diversos tipos de tumores. Los ensayos para la administración de citoquinas, que se están realizando principalmente en pacientes con melanoma metastático, aunque también en casos de carcinoma renal o cáncer de ovario, buscan determinar la dosis y vía de administración más adecuada para cada caso. En 1984 se realizó el primer ensayo clínico para conocer los efectos de la administración de grandes dosis IL2 en pacientes con melanoma y carcinoma renal metastático. A pesar de los efectos beneficiosos respecto al crecimiento tumoral, los efectos secundarios tan perjudiciales derivados del tratamiento hicieron necesarios nuevos estudios. Actualmente, se encuentran en fase I/II diferentes ensayos clínicos para determinar los efectos de la administración de citoquinas como IL12, IL15, IFN $\alpha$ 2b e IL21, que potencian la actividad antitumoral de las células NK<sup>178</sup>. En este sentido, el trabajo publicado recientemente por Pérez-Martínez y colaboradores recoge los efectos derivados de la administración de células NK previamente estimuladas con IL15 tras trasplante haploidéntico de células madre, a pacientes pediátricos con tumores sólidos refractarios, abriendo una nueva puerta al tratamiento de estas enfermedades<sup>179</sup>.

### **3.3. Función inmunomoduladora de las MSCs sobre la población de células NK.**

Como hemos descrito en el apartado 2.3, las MSCs ejercen un efecto inmunosupresor sobre las diferentes poblaciones del sistema inmunitario, incluidas las células NK. Varios estudios



han confirmado la capacidad de las MSCs de reducir la proliferación de las células NK, especialmente de las que están activadas, por arresto en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular. Asimismo inhiben su capacidad para producir diferentes citoquinas, principalmente TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , y su función citotóxica por regulación negativa de los receptores de activación NKp30, NKp44 y NKG2D<sup>180-182</sup>.

Estos cambios, según han confirmado varios estudios, están mediados por la acción sinérgica de diferentes factores solubles, principalmente PGE<sub>2</sub>, IDO y TGF- $\beta$ <sup>180-182</sup>. Además recientemente varios trabajos han sugerido la implicación de los receptores TLR3 y TLR4 en dicha interacción, aunque son necesarios nuevos estudios que lo confirmen<sup>183</sup>.

Esta interacción es especialmente importante en la terapia celular contra el cáncer. Como se ha descrito con anterioridad, la administración de MSCs resulta muy útil en el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped tras trasplante hematopoyético; mientras que las células NK han resultado de gran utilidad para la eliminación de las células leucémicas. Sin embargo, el hecho de que las células NK puedan lisar a las MSCs dependiendo del grado de activación de las primeras y la presencia de moléculas HLA-I en las segundas<sup>184, 185</sup> hace que la administración de ambas de manera simultánea durante el tratamiento pueda reducir la efectividad del mismo, favoreciendo el desarrollo de EMR y, en consecuencia, la recaída en la enfermedad<sup>186, 187</sup>.

#### 4. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS.

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son un grupo de factores de crecimiento que fueron descubiertos en 1965 por Urist en extractos de hueso desmineralizado<sup>188</sup>. Posteriormente se identificaron como factores implicados en la formación de tejido óseo y cartilaginoso<sup>189</sup>. En la actualidad se sabe que son proteínas multifuncionales que, además de participar en la osteogénesis, adipogénesis y condrogénesis, desempeñan un papel muy importante en el desarrollo embrionario y están implicados además en el mantenimiento de la homeostasis de multitud de tejidos y órganos<sup>190-192</sup>, incluida la hematopoyesis, como se explicará a continuación.

Estas proteínas se engloban dentro de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ), constituyendo el subgrupo más numeroso con más de 20 miembros identificados hasta la fecha en mamíferos. Junto a ellas, forman parte de esta superfamilia las activinas, inhibinas, proteínas TGF- $\beta$ , Nodal, Miostatina y hormona anti-Mulleriana<sup>192, 193</sup>. Las BMPs se clasifican a su vez en los grupos que se enumeran a continuación, dependiendo de sus propiedades estructurales y funcionales: el grupo BMP2/4 formado por los miembros BMP2 y BMP4; el grupo BMP3 con BMP3 y BMP3b (GDF10); el grupo BMP5/6/7/8 también llamado grupo de la proteína osteogénica 1 (OP-1) formado por BMP5, BMP6, BMP7, BMP8a y BMP8b; el grupo de factores de crecimiento y diferenciación formado por GDF5/CDMP1/BMP14, GDF6/CDMP2/BMP13, GDF7/CDMP2/BMP12 y BMP15; y el grupo de BMP9/10 formado por BMP9 y BMP10<sup>192, 194</sup>. Todas ellas presentan una distribución espacio-temporal y una actividad biológica diferente, que vienen determinadas por su disponibilidad a un tipo celular concreto más que por su nivel de expresión<sup>194, 195</sup>.

Las BMPs se sintetizan como precursores de gran tamaño, formados por unos 400-500 aminoácidos, que constan de un péptido señal en la región N-terminal, responsable de dirigir la proteína hacia la vía de secreción; un pro-dominio encargado de su plegamiento y un péptido maduro en la región C-terminal. En su forma activa están formados por unos 50-100 aminoácidos, con siete residuos cisteína de los cuales seis forman puentes disulfuro intramoleculares. El residuo de cisteína restante forma un enlace disulfuro intermolecular con otro polipéptido, dando lugar a dímeros. Las BMPs se secretan normalmente en forma

de homodímeros, aunque también aparecen en forma de heterodímeros cuya efectividad para activar la vía de señalización puede ser mayor que sus respectivos homodímeros<sup>192, 194, 196-199</sup>.

#### 4.1. Componentes de la vía de señalización BMP.

Los ligandos BMP señalizan a través de complejos transmembrana heteroméricos formados por receptores serín-treonín quinasa de tipo I y de tipo II, que se encuentran en la superficie celular en forma de homo- o heterodímeros. Los ligandos pueden interactuar con los receptores tipo I en ausencia de los receptores tipo II, pero para la transducción de la señal es necesaria la presencia de ambos<sup>193</sup>.

Tras producirse la interacción con el ligando, los receptores tipo II, que se encuentran activos de forma constitutiva, transfosforilan a los receptores tipo I, encargados de transducir la señal. Las proteínas BMP pueden activar diferentes vías de señalización, siendo la más conocida y estudiada la vía de señalización canónica dependiente de las proteínas Smad<sup>200</sup>. Tras la fosforilación del receptor tipo I, éste recluta y fosforila a las proteínas específicas de BMP, Smad reguladas por receptor (BR-Smad), que forman complejos con la proteína Smad mediadora común (Co-Smad). Dichos complejos se traslocan al núcleo donde regulan la transcripción de diferentes genes a través de la interacción con factores de transcripción, co-activadores y co-represores<sup>193, 200</sup> (Figura 6).

Los receptores tipo I y tipo II presentan una estructura similar, con un dominio extracelular corto, un único dominio transmembrana y un dominio intracelular donde se localiza el dominio serín-treonín quinasa. Se han identificado siete receptores tipo I dentro de la superfamilia TGF- $\beta$ , que se clasifican en tres grupos diferentes en base a sus características estructurales y funcionales: el grupo BMPRI, formado por BMPRIA/ALK-3 y BMPRIB/ALK-6; el grupo ALK-1, formado por ActRLK1/ALK-1 y ActRIA/ALK-2; y el grupo T $\beta$ RI, formado por ALK-4, ALK-5 y ALK-7. Entre ellos, los receptores BMPRIA/ALK-3, BMPRIB/ALK-6 y ActRIA/ALK-2 han sido identificados como responsables de la activación de las proteínas BR-Smad en respuesta a los ligandos BMP. Estos receptores se expresan de manera diferente, siendo BMPRIA el que presenta un patrón de expresión más amplio, al contrario que BMPRIB cuya expresión se restringe a determinados tipos celulares<sup>193</sup>. Las proteínas BMP presentan una mayor afinidad por los receptores tipo I, que son los que condicionan el tipo

de ligando que se une, si bien esta puede verse modificada por el receptor tipo II presente en el complejo. Así los receptores BMPRIA y BMPRIB interaccionan fundamentalmente con las proteínas del grupo BMP2/4, mientras que otros ligandos como BMP6 y BMP7 interaccionan con ActRIA y, en menor medida, con BMPRIB<sup>193, 201</sup> (Figura 6). Respecto al grupo de receptores tipo II, se han identificado en mamífero tres receptores con estructuras similares: BMPRII, ActRIIA y ActRIIB, siendo el primero exclusivo para ligandos BMP, mientras que los otros dos interaccionan también con activinas y miostatina<sup>193, 202</sup>.

Ante la unión del ligando y la posterior fosforilación del receptor tipo I, se inicia la transducción de la señal que en el caso de la ruta canónica está mediada por las proteínas Smad. Se han identificado ocho proteínas Smad comunes para todos los componentes de la superfamilia TGF- $\beta$ , que se clasifican en tres grupos: las Smad reguladas por receptor entre las que se encuentran las Smad1, Smad5 y Smad8 específicas de BMP y las Smad2 y Smad3 que son activadas por TGF- $\beta$  y activinas (AR-Smads); la Smad mediadora común Smad4 compartida por ambas señales y las Smad inhibitoras Smad6 y Smad7, encargadas de la regulación de la vía (I-Smads)<sup>200</sup>.

Las BR-Smads son proteínas estructuralmente muy similares, de las que se desconocen diferencias funcionales. Presentan un dominio MH1 en la región N-terminal, encargado de su traslocación al núcleo e interacción con el ADN, y un dominio MH2 en la región C-terminal que interacciona con el receptor y otras Smads, y participa en la transducción de la señal. En su forma inactiva ambos dominios se encuentran interaccionando entre sí, bloqueando la función de la proteína. La fosforilación llevada a cabo por el receptor tipo I sobre el dominio MH2 induce un cambio conformacional que permite la unión con la Co-Smad formando un complejo que se transloca al núcleo para regular la transcripción de determinados genes<sup>193</sup>.

Entre los diferentes genes diana que se inducen a través de la vía de señalización canónica destacan los genes ID, expresados en multitud de tipos celulares y muy importantes en la regulación de las funciones biológicas llevadas a cabo por las proteínas BMP<sup>203, 204</sup>. En mamíferos se han identificado cuatro genes ID (ID1-4) que interaccionan con los factores de transcripción HLH formando heterodímeros no funcionales e impidiendo su unión al ADN. Estas moléculas altamente conservadas están implicadas en multitud de procesos

biológicos, especialmente en el mantenimiento de la hematopoyesis donde son responsables del bloqueo de la diferenciación de los progenitores<sup>205</sup>.

Los factores de transcripción RUNX (RUNX1-3) son también genes diana de la vía de señalización BMP. Están implicados en diferentes procesos biológicos como hematopoyesis, angiogénesis y osteogénesis y además participan de forma activa en la transcripción de otros genes diana de dicha vía mediante la interacción con las proteínas BR-Smads<sup>206, 207</sup>.

Las proteínas BMP regulan además la transcripción de algunos microRNAs implicados en proliferación celular, diferenciación y desarrollo de determinados tejidos y órganos<sup>208</sup>. Asimismo, los propios componentes de la vía son genes diana, como es el caso de *Smad6* y *Smad7* que poseen en su región promotora elementos de respuesta a BMP (BREs), lo que indica la existencia de mecanismos intrínsecos de regulación de la señal inducida por los ligandos BMP<sup>209, 210</sup>.

Por otro lado, como se ha indicado anteriormente, los ligandos BMP pueden activar otras vías de señalización independientes de las proteínas Smad. En estas rutas no canónicas están implicadas diferentes proteínas MAPKs, como la proteína TAK1 que forma un complejo con la proteína TAB1 encargado de iniciar las rutas de señalización de las proteínas MAPK JNK, ERK y p38 entre otras, y cuya finalidad última sería la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B<sup>193, 200, 211</sup>. Asimismo, la proteína TAK1 participa en la regulación de la activación de las BR-Smad, lo que indica la estrecha relación existente entre ambas vías<sup>212</sup>. Adicionalmente, se ha observado que los ligandos BMP pueden señalizar además a través de las proteínas PI3K/AKT y GTPasas<sup>211</sup>. Numerosos trabajos han tratado de identificar los mecanismos que median en la activación de una u otra vía de señalización. La interacción de los ligandos con receptores preformados presentes en la superficie celular o la inducción de la formación de nuevos complejos activarían la vía de señalización dependiente o independiente de Smad, respectivamente. Adicionalmente, la diferente afinidad que presentan los ligandos por los distintos complejos receptores también determinaría el tipo de ruta que se activa<sup>213, 214</sup>.

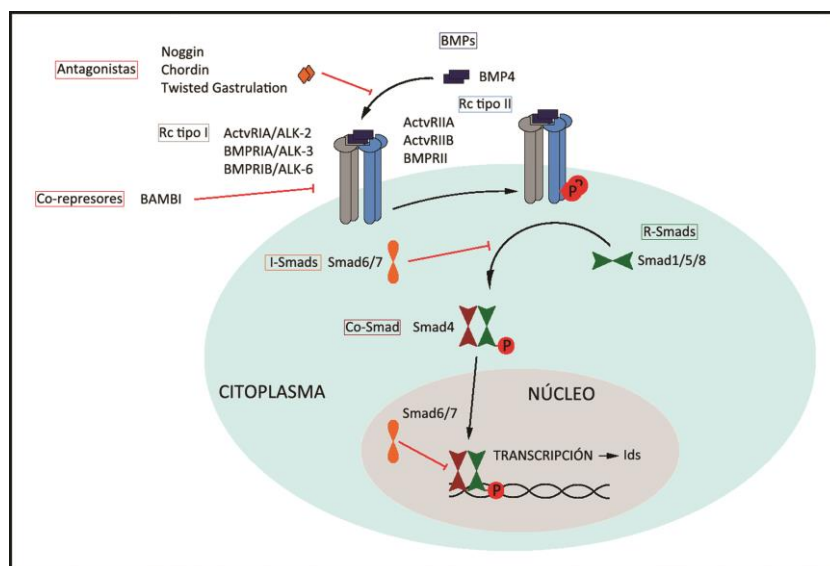
## 4.2. Regulación de la vía de señalización BMP.

El hecho de que la vía de señalización BMP esté implicada en múltiples procesos ha determinado el desarrollo de numerosos mecanismos de regulación tanto intracelulares como extracelulares<sup>194, 215</sup>. A nivel extracelular existen varios antagonistas solubles que interaccionan con los ligandos BMP, bloqueando el sitio de unión al complejo receptor. Actualmente se han identificado más de 15 miembros que se han clasificado en tres subgrupos: el grupo Noggin/Chordin, Twisted Gastrulation y la familia Dan/Cerberus formada por Gremlin, Coco y Cerberus entre otros<sup>215-217</sup>. Se secretan en forma de homodímeros y presentan diferente afinidad por los ligandos BMP, como es el caso de Noggin que interacciona con mayor afinidad con BMP2 y BMP4 en comparación con BMP7<sup>218</sup>, al igual que sucede con Gremlin<sup>219</sup>. La unión de estos antagonistas impide la activación de la vía, pudiendo algunos de ellos activar otras rutas de señalización como la vía Nodal/TGF- $\beta$  o Sonic Hedgehog<sup>220</sup>. Asimismo, pueden llevar a cabo acciones no antagónicas como ocurre con Noggin que favorecería la diferenciación osteogénica de las MSCs<sup>221</sup>, Twisted Gastrulation que puede inducir la degradación de Chordin a través de su interacción con BMP1<sup>215</sup> o Coco, miembro de la familia Dan, que favorece la unión de TGF- $\beta$ 1 a su receptor ALK-5<sup>222</sup> (Figura 6). Adicionalmente, la inhibición de la vía BMP a nivel extracelular puede deberse a la presencia de otros miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  que compiten por unirse al receptor, como ocurre con Activina A que bloquea la unión de BMP6 y BMP9 con los receptores ActRIIa y ActRIIB<sup>223</sup>. Asimismo, en los últimos años se han identificado numerosos miRNAs con función antagónica, responsables de la regulación de la transcripción de diferentes genes diana de la vía de señalización BMP<sup>217</sup>.

A nivel de membrana, la interacción del ligando con el complejo receptor se ve modulada tanto de manera positiva como negativa. Aunque la unión del ligando es suficiente para la transducción de la señal, existen diferentes co-receptores capaces de intensificarla. Es el caso de la familia de proteínas RGM, con RGMa, RGMb/DRAGON y RGMc/Hemojuvenila que amplifican la señal de los ligandos BMP2 y BMP4 por interacción con los receptores tipo I y tipo II<sup>224, 225</sup>. Por otro lado, la proteína Endoglin presente en las células endoteliales es capaz de amplificar la respuesta a BMP2 y BMP7 entre otros ligandos de la superfamilia de TGF- $\beta$ <sup>226</sup>. En este mismo grupo de moduladores se ha incluido recientemente el receptor TGF $\beta$ III o betaglicano que amplifica la fosforilación de Smad1 en respuesta a

diferentes ligandos<sup>227</sup>. A este nivel existen también reguladores negativos de la vía, como el pseudorreceptor BAMBI, estructuralmente muy similar a los receptores tipo I pero que carece del característico dominio intracelular. Este pseudorreceptor interacciona con los receptores de tipo I y II, bloqueando el sitio de unión e inhibiendo la respuesta a los diferentes ligandos<sup>228</sup>. Adicionalmente existen otras proteínas tirosin-quinasa capaces de bloquear la transducción de la señal, como la proteína TrkC o Ror2, que bloquean los receptores tipo II y la interacción GDF5/BMPRII respectivamente<sup>229, 230</sup> (Figura 6).

Por último, las Smad inhibidoras Smad6 y Smad7, son responsables de la regulación negativa de la vía a nivel intracelular, actuando mediante diferentes mecanismos. Por un lado, interaccionan con los receptores tipo I ya activados impidiendo la fosforilación de las R-Smads<sup>231</sup> o bien compiten con la Co-Smad por la unión a las R-Smads<sup>232</sup>. A nivel nuclear, impiden la formación de los complejos ADN-Smad al bloquear las secuencias de respuesta a Smads<sup>233</sup>. Smad7 es capaz de inhibir tanto la ruta TGF- $\beta$ /Activina como BMP; sin embargo, Smad6 es exclusiva de esta última<sup>234</sup>. Asimismo, estas Smads pueden mediar en el bloqueo de la señalización BMP dependiente de Smurf1 y Smurf2. Estas son unas proteínas E3 ubiquitin ligasa responsables de la poliubiquitinación de las Smad1 y Smad5 para su posterior degradación via proteasoma<sup>232, 235</sup>.



**Figura 6: Transducción de la señal BMP.** Los ligandos BMP activados interaccionan con los complejos receptores induciendo la fosforilación de los receptores tipo I, a cargo de los receptores tipo II que se encuentran

*constitutivamente activados. Se activan varias vías de transducción entre las que destaca la ruta canónica que señala a través de las proteínas Smads. Las BR-Smads son fosforiladas por los receptores tipo I y forman complejos con la Co-Smad, translocándose posteriormente al núcleo donde inducen la expresión de diferentes genes diana. Existen diferentes mecanismos destinados a la regulación de esta ruta de señalización, actuando a nivel extracelular a través de diferentes antagonistas, a nivel de membrana mediante co-represores o a nivel intracelular gracias a las I-Smads.*

#### 4.3. Función de las proteínas morfogenéticas óseas.

Como hemos mencionado al inicio de este apartado, las proteínas BMP se describieron como proteínas responsables de la formación de hueso y cartílago. En este sentido, varios trabajos han descrito su papel fundamental en la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales, induciendo la expresión de genes imprescindibles para este proceso como son *Runx2* y *Osterix*<sup>192, 236</sup>. Asimismo, también se ha comprobado su implicación en la diferenciación condrogénica y adipogénica de estos progenitores<sup>237, 238</sup>. Entre los ligandos responsables de esta diferenciación destaca BMP2, cuya presencia es suficiente para llevar a cabo dicho proceso como han comprobado diferentes autores<sup>237-239</sup>. Sin embargo la función de estas proteínas no se reduce exclusivamente a formación de hueso o cartílago, sino que presentan gran cantidad de actividades biológicas. Durante la embriogénesis de mamíferos, estos ligandos participan de manera activa en procesos esenciales como son la determinación de la asimetría derecha e izquierda, formación del mesodermo, patrón neural, desarrollo del esqueleto y extremidades, gametogénesis y organogénesis<sup>240</sup>. En este sentido, estudios *in vivo* con modelos de ratón deficientes para los ligandos *Bmp2* y/o *Bmp4* y para los receptores *Bmpr1a* y *Bmpr1l* han confirmado la importancia de esta vía de señalización durante la gastrulación<sup>241-243</sup>.

Asimismo, son fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis de diferentes órganos y sistemas tanto en fase embrionaria como adulta, regulando la proliferación, diferenciación y quimiotaxis de los distintos tipos celulares. En esta línea destaca su implicación en la regulación de la hematopoyesis, como se ha confirmado en varios trabajos<sup>244, 245</sup>.

La hematopoyesis embrionaria se inicia en pequeños agregados de células en el mesodermo esplenopleural asociado a la pared de la aorta y posteriormente en la región aorta-gónadas-mesonefros (AGM). La diferenciación hematopoyética de estos agregados celulares se demostró que estaba regulada por BMP4 responsable de su expansión y



mantenimiento de su multipotencialidad, originando el *pool* de células madre hematopoyéticas que darán lugar a la hematopoiesis adulta<sup>246, 247</sup>.

En edad adulta, las proteínas BMPs, junto a otras proteínas de la superfamilia TGF- $\beta$ , están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de las HSCs, regulando su proliferación, diferenciación, migración y apoptosis. Esta regulación, sin embargo, está condicionada por diferentes factores como son el microambiente, la presencia de otros factores con funciones aditivas o inhibitorias, el grado de diferenciación celular, su concentración y su producción autocrina o paracrina<sup>248</sup>. Así, el ligando BMP4 a concentraciones elevadas inhibe la proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos, mientras que a dosis bajas induce su diferenciación<sup>249, 250</sup>.

Igualmente estas proteínas participan en etapas más avanzadas de la diferenciación de distintos linajes, así como en el estadio madurativo de las poblaciones de células sanguíneas. En esta línea, recientemente nuestro grupo ha descrito la implicación del ligando BMP4 en la homeostasis y activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> naïve<sup>251</sup>, ligando que también es responsable de la generación de linfocitos B a partir de precursores CD10<sup>+</sup> de médula ósea<sup>252</sup>. Por el contrario, el ligando BMP6 inhibe la proliferación de dichos progenitores, además de bloquear la proliferación y diferenciación de células B maduras<sup>253, 254</sup>. En cuanto a su importancia en la biología de células dendríticas, estudios realizados por nuestro grupo han permitido determinar el papel que desempeñan dichos ligandos en la supervivencia y maduración de estas células, así como en el mantenimiento de su capacidad funcional<sup>255</sup>. Por último, en 2014, en colaboración con el grupo del Dr. Robson, nuestro grupo describió la importancia de la vía de señalización BMP2/4 autocrina en el mantenimiento de la capacidad proliferativa y funcional de las células NK<sup>256</sup>.

Sin embargo, la importancia de esta vía de señalización en el mantenimiento de la hematopoyesis no reside sólo en su acción directa sobre los progenitores o sobre las diferentes poblaciones de células maduras. También participa de forma activa regulando la biología de otros tipos celulares que constituyen el nicho hematopoyético y que, como hemos descrito anteriormente, son fundamentales para el correcto desarrollo de la hematopoyesis. En este sentido Zhang y colaboradores demostraron en 2003 que el bloqueo de la vía de señalización BMP2/4 por mutaciones en el gen que codifica para el

receptor BMPRIA, inducía un incremento en el tamaño del nicho medular y, en consecuencia, del número de HSCs presentes en el nicho <sup>36</sup>. Posteriormente Goldman y colaboradores determinaron la expresión de BMP4 en las células endoteliales, osteoblastos y células de la región perivascular del estroma medular y comprobaron cómo su ausencia era responsable de una deficiencia en la hematopoyesis <sup>244</sup>. Años más tarde Khurana y colaboradores demostraron la implicación de rutas no canónicas en el mantenimiento de las HSCs <sup>257</sup>. Asimismo, comprobaron en ensayos *in vivo* que la administración del antagonista soluble Noggin incrementaba la producción de CXCL12 por parte de las células del estroma medular, especialmente los osteoblastos, favoreciendo la llegada y mantenimiento de las HSCs en la médula ósea <sup>257</sup>.

Adicionalmente estudios *in vitro* sobre la población de células madre mesenquimales han confirmado el papel fundamental de esta vía de señalización en el mantenimiento de la biología de estas células. Así, MSCs aisladas de médula ósea reducen su viabilidad y proliferación tras administración de dosis altas de BMP4 al cultivo <sup>258</sup>, al igual que ocurre con la administración de BMP2 <sup>259</sup>. Sin embargo, la inhibición de la vía de BMP autocrina por el antagonista Noggin en cultivos libres de suero induce la muerte de las células vía caspasas <sup>260</sup>.

A tenor de lo expuesto anteriormente, es evidente la relevancia de la señalización BMP en multitud de procesos biológicos. Por ello, no es extraño que un gran número de patologías hayan sido asociadas a defectos en esta vía de señalización, incluidos los procesos tumorales. Numerosos estudios han confirmado la expresión aberrante de estas proteínas o de sus antagonistas en diferentes tumores, si bien las consecuencias de dichas alteraciones en el desarrollo y progresión de la enfermedad aún no se conocen con certeza <sup>261</sup>.

#### **4.4. Proteínas morfogenéticas óseas en el contexto tumoral.**

Los estudios para conocer la implicación de la vía de señalización BMP2/4 en el desarrollo de diferentes tumores se han multiplicado notablemente en los últimos años. Diferentes trabajos han buscado correlacionar las alteraciones en la vía con la predisposición a padecer determinados tipos de cáncer. Hasta el momento, sin embargo, no ha podido ser definido un comportamiento general pro- o antitumoral para estas moléculas que podría ser dependiente del tipo del tumor, su estadio o la recurrencia o no del mismo.

En la mayor parte de los tumores estudiados, tanto sólidos como hematológicos, se ha encontrado una expresión aberrante de diferentes ligandos BMP, que se ha relacionado con un mal pronóstico, favoreciendo la evolución de la enfermedad y, en consecuencia, reduciendo la supervivencia de los pacientes. En concreto, en diferentes tumores se ha descrito una correlación entre el incremento de los ligandos BMP2, BMP4 y BMP7 y un mayor riesgo de recaída <sup>262-266</sup>. Por el contrario, otros trabajos obtienen una correlación positiva entre este incremento de la expresión de ligandos BMP y un mejor pronóstico de la enfermedad. En este sentido, un aumento de BMP6 por células plasmáticas de la médula ósea de pacientes con mieloma múltiple o el aumento de BMP2 y BMP4 en pacientes con histiocitoma o glioma de estadios de diferenciación avanzados, favorece la supervivencia <sup>267-269</sup>. Finalmente también ha sido descrita la asociación entre niveles reducidos de BMP2/BMP4, la progresión de la enfermedad y una menor supervivencia en tumores de ovario, leucemia mieloide crónica y mama <sup>270-272</sup> (Anexo Tabla I).

En cuanto a la repercusión de los cambios que acontecen en la expresión de los diferentes receptores BMPs en relación con la supervivencia de los pacientes, tampoco los resultados son concluyentes. Así, mientras que Dziatczenia y colaboradores describen una correlación entre niveles incrementados de los receptores BMPRIA, BMPRIB y BMPRII y una menor supervivencia en leucemia linfocítica crónica, estos mismos autores demuestran que niveles incrementados de estos receptores en leucemia aguda resulta en una mejor respuesta al tratamiento y menor riesgo de recaída <sup>273, 274</sup>. Los estudios en diferentes tumores sólidos han revelado, como en el caso de los hematológicos, correlaciones tanto positivas como negativas entre los niveles de expresión de los diferentes receptores BMP y la supervivencia de los pacientes <sup>264, 275-281</sup> (Anexo Tabla II).

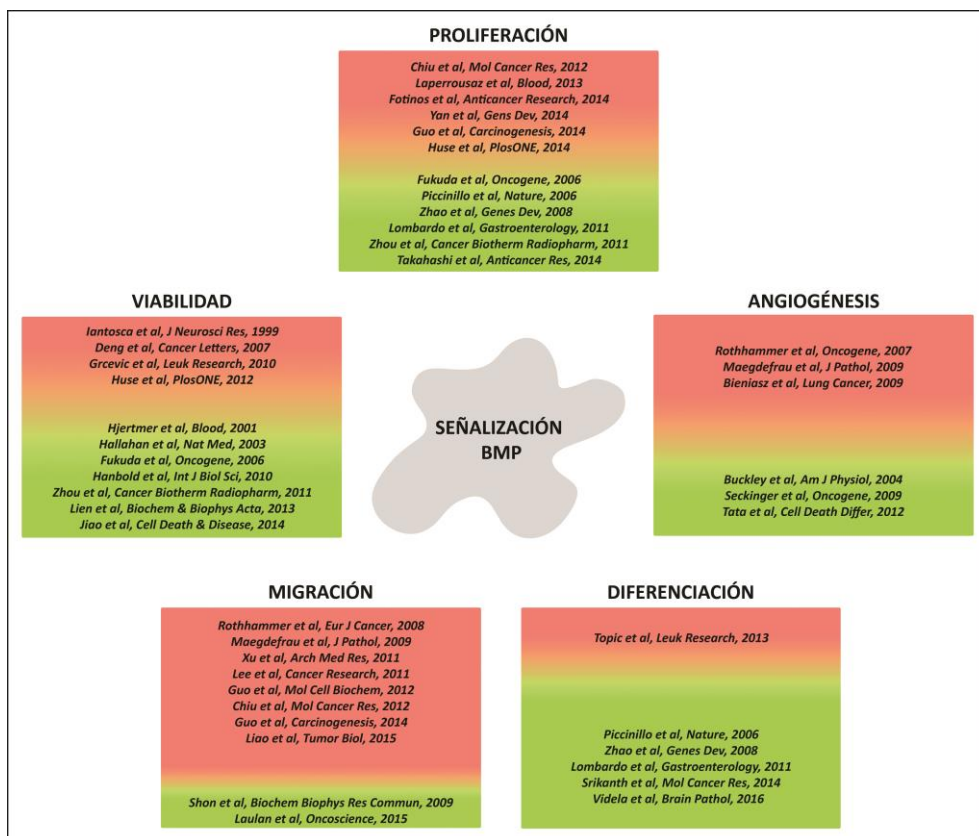
Junto con estas alteraciones se han encontrado también cambios a nivel de la expresión de las proteínas transductoras de la señal BMP. En células mononucleares de médula ósea de pacientes con leucemia mieloide crónica se ha observado que el aumento de ligandos y receptores va acompañado de una reducción de las BR-Smads Smad 1 y Smad8, y de la Co-Smad Smad4, lo que sugiere la activación de las rutas no canónicas para transducir la señal BMP <sup>265</sup>. Igualmente, en cáncer colorrectal la reducción de la expresión de las proteínas BR-Smads y Co-Smad, junto con los niveles incrementados de BMP4 observado en los pacientes, sugiere que éste puede estar activando rutas no canónicas <sup>282, 283</sup>. Por el

contrario, en diferentes carcinomas, es el aumento en la expresión de estas proteínas Smad el que favorece la progresión de la enfermedad<sup>283-285</sup> (Anexo Tabla III).

Finalmente, diferentes trabajos han analizado los niveles de expresión de los reguladores negativos de la vía, tanto extracelulares como intracelulares. Así, en leucemia mieloide crónica, además de todas las alteraciones descritas anteriormente, se ha observado un aumento de las I-Smads y del antagonista Gremlin en las células madre leucémicas (LSCs), que favorece su mantenimiento y la progresión de la enfermedad<sup>265</sup>. En línea con estos resultados, también se ha encontrado en pacientes con cáncer de útero y gliomas un aumento de Gremlin que favorece la supervivencia de las células madre cancerígenas (CSCs)<sup>286, 287</sup>. En carcinoma esofágico, por el contrario, el mantenimiento de esta población se ha asociado a una menor producción de Noggin<sup>288</sup> (Anexo Tabla IV).

Paralelamente a estos estudios que describen cambios en los diferentes componentes de la vía de señalización BMP, se han desarrollado trabajos encaminados a dilucidar el papel de estos ligandos en la biología de la célula tumoral. De nuevo, como se recoge en la Figura 7, los resultados publicados son contradictorios. Mientras que la adición de BMP4 induce la proliferación en carcinoma hepatocelular y leucemia mieloide crónica<sup>265, 289</sup>, en carcinoma colorrectal, glioma, linfomas, mieloma múltiple y algunas leucemias, reduce su tasa proliferativa<sup>290-294</sup>. Una heterogenidad similar en los resultados obtenidos se pone de manifiesto en los datos relativos a los efectos de BMP4 en la viabilidad de las células tumorales, habiéndose descrito tanto efectos pro-apoptóticos como inductores de la supervivencia<sup>290, 293, 295-298</sup>. En lo que concierne a sus efectos en diferenciación celular, si bien los resultados son escasos, en la mayoría de los tumores analizados la adición de BMP4 exógeno induce diferenciación de la célula tumoral<sup>291, 292, 299, 300</sup>. En migración, los efectos de la adición del ligando son principalmente protumorales en la mayor parte de los casos estudiados, favoreciendo la invasión y metastatización de otros tejidos<sup>289, 301-303</sup>.

En conjunto, estos estudios demuestran la implicación de la vía de señalización BMP en el desarrollo y progresión del proceso tumoral, si bien su efecto positivo o negativo necesita ser dilucidado con estudios sistemáticos que incluyan más datos clínicos como tipo de tumor o estadio del mismo y el tipo de célula, tumoral o del microambiente, responsable de los cambios observados.



**Figura 7: Implicación de los diferentes componentes de la vía de señalización BMP en la biología del tumor.** En rojo se indica el porcentaje de estudios que describen efectos protumorales y en verde el porcentaje de estudios que describen efectos antitumorales sobre la proliferación, viabilidad, migración, angiogénesis y diferenciación de células de tumores sólidos y hematológicos (Ver Anexo II).

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Hasta el momento, diferentes trabajos han estudiado la implicación de las células madre mesenquimales, principales componentes del nicho medular, en el desarrollo de enfermedades hematológicas, confirmando diferencias de las MSCs de los pacientes en cuanto a su fenotipo, capacidad de proliferación y diferenciación y producción de citoquinas. Resultan, sin embargo, mucho más escasos los estudios dirigidos a conocer las posibles diferencias en la capacidad inmunomoduladora de estas células, centrándose además los escasos trabajos publicados en conocer sus efectos sobre linfocitos T, sin analizar otras poblaciones celulares del sistema inmunitario relevantes en la función antitumoral.

Asimismo, aunque cada vez es más evidente la implicación de la vía de señalización BMP en el desarrollo de diferentes tumores, la descripción de efectos tanto protumorales como antitumorales hace necesario un análisis más exhaustivo de su función.

Por tanto, el objetivo global del presente trabajo será analizar el comportamiento inmunomodulador de la población de células madre mesenquimales del estroma medular, así como el papel de la proteína BMP4 en el desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda. Para ello planteamos los siguientes objetivos concretos:

1. Analizar el comportamiento inmunomodulador de las células madre mesenquimales de pacientes de leucemia linfoblástica aguda en el momento del diagnóstico y a lo largo del tratamiento, en relación con la función de las células NK.
2. Determinar los mecanismos que median esta función inmunomoduladora.
3. Analizar en las MSCs la expresión de los componentes de la vía de señalización BMP así como la posible implicación en sus propiedades inmunomoduladoras.
4. Analizar la expresión de los componentes de la vía de señalización BMP en las células leucémicas y su capacidad para modular la susceptibilidad de estas células a la lisis mediada por células NK.
5. Estudiar la interacción de las células leucémicas con la población de células NK y evaluar las posibles alteraciones en la función antitumoral de estas últimas.





## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Muestras de pacientes.

Para el presente estudio se han obtenido aspirados de médula ósea de pacientes pediátricos diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA-B) del Hospital Universitario del Niño Jesús, entre los años 2004 y 2012. Los aspirados se obtuvieron en el momento del diagnóstico y en algunos casos también a los 15 días y 35 días tras iniciarse la terapia siguiendo el protocolo PETHEMA (Protocolo Español para Hemopatías Malignas) <sup>8</sup>. Los aspirados se realizaron siempre para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, no haciéndose extracciones adicionales en ninguno de los casos. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de dicho hospital, tras consentimiento escrito informado de los padres o tutores de los pacientes y garantizando el anonimato de los pacientes. Las características clínicas de dichos pacientes están recogidas en la Tabla 2.

Número de pacientes		57
Edad (años)		6 (0,2-15)
Sexo		28 F, 29 M
Inmunofenotipo	LLA pro-B	6
	LLA B común	44
	LLA pre-B	7
Riesgo de recaída	RA	15
	RI	16
	RB	24
Recaída		11 SI, 46 NO
Éxito		7 SI, 50 NO

**Tabla 2: Datos clínicos de los pacientes con LLA.** LLA: Leucemia linfoblástica aguda; M: masculino; F: Femenino; RB: Riesgo bajo; RI: Riesgo intermedio; RA: Riesgo alto.

Para la obtención de las células madre mesenquimales se utilizaron muestras de aspirados de médula ósea de 16 de estos pacientes (MSC-LLA). Se tuvo acceso además a los aspirados de médula ósea de tres pacientes ya recuperados, un año después del tratamiento (MSC-FT). Las características de todos estos pacientes se muestran en la Tabla 3. Como controles se usaron aspirados de médula ósea de 8 pacientes pediátricos no diagnosticados de enfermedades hematológicas (MSC-DS).

PACIENTE	EDAD	SEXO	INMUNOFENOTIPO	ALTERACIÓN GENÉTICA	RIESGO DE RECAÍDA	SITUACIÓN ACTUAL
1	2	F	LLA pro-B	ND	RI	Segundo año en remisión completa
2	6	M	LLA B común	t(12;21) ETV6-RUNX1	RB	Tercer año en remisión completa
3	5	F	LLA pre-B	ND	RI	Cuarto año en remisión completa
4	2	M	LLA pro-B	ND	RI	Recaída durante el tratamiento Trasplante haploidéntico
5	10	M	LLA B común	ND	RB	Tercer año en remisión completa
6	10	M	LLA B común	ND	RB	Tercer año en remisión completa
7	5	M	LLA B común	ND	RI	Segundo año en remisión completa
8	4	F	LLA B común	ND	RI	Segundo año en remisión completa
9	2	M	LLA pre-B	ND	RB	En tratamiento Remisión completa
10	2	M	LLA B común	ND	RI	Recaída Trasplante alogénico
11	6	M	LLA B común	ND	RB	En tratamiento Remisión completa
12	1	F	LLA pro-B	t(4;11) MLL-AF4	RA	Recaída durante el tratamiento Fallecido
13	14	M	LLA B común	t(9;22) BCR-ABL1	RA	Recaída durante el tratamiento
14	9	F	LLA B común	t(12;21) ETV6-RUNX1	RI	Cuarto año en remisión completa Recuperado, fuera de tratamiento
15	10	M	LLA B común	ND	RB	Cuarto año en remisión completa Recuperado, fuera de tratamiento
16	6	F	LLA B común	ND	RI	Cuarto año en remisión completa Recuperado, fuera de tratamiento

**Tabla 3: Datos clínicos de los pacientes con LLA de los que se obtuvieron muestras de MSCs.** LLA: Leucemia linfoblástica aguda; M: masculino; F: Femenino; ND: No determinado; RB: Riesgo bajo; RI: Riesgo intermedio; RA: Riesgo alto.

## 2. Obtención y cultivo de células madre mesenquimales.

A partir de los aspirados de médula ósea, se obtuvieron las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad. Posteriormente estas células se cultivaron en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) suplementado con 100U/ml de penicilina (Lonza-Hopkinton, MA, EEUU), 100µg/ml de estreptomina (Lonza-Hopkinton) y suero fetal bovino al 10% (Invitrogen, Life Technologies). Los cultivos se realizaron en flask de 25 cm<sup>2</sup> en un incubador a 37°C, en una atmosfera húmeda y al 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 48 horas se reemplazó el medio de cultivo, eliminando con ello las células que habían quedado en suspensión, y las que quedaron adheridas al plástico se expandieron en medio definido MesenPRO (Gibco,

Life Technologies), suplementado con 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y 2mM de L-glutamina (Lonza-Hopkinton). El medio de cultivo se reemplazó cada 5 días hasta alcanzar un grado de confluencia del 80-90%. Una vez alcanzada dicha confluencia, se recuperaron las células usando para ello una solución de tripsina al 0,25% (Gibco, Life Technologies) y se contaron en viabilidad con Trypan Blue (Merck Millipore, Sigma-Aldrich, España). En todas las muestras obtenidas se determinó tanto la ausencia de marcadores hematológicos mediante citometría de flujo como la capacidad de diferenciación adipogénica y osteogénica.

Para obtener el número necesario de células para realizar los diferentes experimentos, se procedió a su expansión cultivándolas a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en el medio antes mencionado. Una vez obtenido un número de células óptimo, según el diseño experimental, se procedió a su cultivo en las mismas condiciones descritas con anterioridad, en placas de 24 pocillos de fondo plano y a diferentes tiempos. En los experimentos donde se indica, el medio fue suplementado con BMP4 recombinante humano (Humanzyme Inc., Chicago, EEUU) a las concentraciones de 0,01 y 100ng/ml, o con diferentes inhibidores de la vía de señalización BMP2/4: DMH1 (10µM; Tocris Bioscience, R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU), el antagonista soluble Noggin (500ng/ml, Humanzyme Inc.) y el receptor soluble BMPRIA (3µg/ml, R&D Systems). Estas células fueron empleadas para el estudio de su fenotipo por citometría de flujo, así como para el análisis de la producción y expresión de diferentes factores inmunomoduladores. También se usaron en el establecimiento de cocultivos con células NK aisladas de donantes sanos o con líneas leucémicas. En todos los estudios realizados las células empleadas se encontraban entre los pases 4-7 de cultivo.

### **3. Ensayos de diferenciación de las células madre mesenquimales.**

Se realizaron ensayos para determinar la capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica de las MSCs, tanto de donantes sanos como de pacientes en el momento de diagnóstico.

Para ello se cultivaron durante 6 días dichas células a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio MesenPRO suplementado con 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y 2mM de L-glutamina. Transcurrido ese periodo de tiempo se transfirieron durante 1 día a medio condicionado compuesto por DMEM (Gibco, Life Technologies) para la

diferenciación adipogénica y  $\alpha$ MEM (Gibco, Life Technologies) para la osteogénica, suplementados ambos con un 5% de suero fetal bovino, 100U/ml de penicilina y 100 $\mu$ g/ml de estreptomicina.

Finalmente se transfirieron a un medio específico para su diferenciación, donde fueron cultivadas durante 15 – 20 días. El medio osteogénico incluía  $\alpha$ MEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 10nM de dexametasona, 10nM de  $\beta$ -glicerofosfato y 60 $\mu$ M de ácido ascórbico (todos de Sigma-Aldrich) con 100U/ml de penicilina y 100 $\mu$ g/ml de estreptomicina. Para la diferenciación adipogénica el medio contenía 1:1 DMEM, F-12 Nutrient Mixture (Ham) (Gibco, Life Technologies) suplementado con 3% de suero fetal bovino, 1 $\mu$ M de dexametasona, 60 $\mu$ M de indometacina y 0,5mM de IBMX (todos ellos de Sigma-Aldrich) con 100U/ml de penicilina y 100 $\mu$ g/ml de estreptomicina.

Pasado el tiempo indicado, la diferenciación osteogénica fue evaluada en términos de actividad de la fosfatasa alcalina en 50 $\mu$ l de lisado celular y normalizado al contenido total de proteína. Para evaluar la diferenciación adipogénica se realizaron tinciones con Oil O Red (ORO) y azul de Coomassie. La ratio entre ambas absorbancias determinó el contenido específico de lípidos.

#### **4. Obtención y cultivo de células leucémicas.**

Para los estudios de expresión génica se incluyeron muestras de los 57 pacientes diagnosticados de LLA-B cuyas características se han indicado en la Tabla 1 del primer apartado. Dichas muestras se usaron para extracciones de ARN y posterior análisis por PCR cuantitativa de diferentes genes. En aquellas muestras en las que fue posible, se realizó además el análisis de diferentes marcadores de superficie mediante citometría de flujo.

Sin embargo, ante la dificultad para cultivar las células primarias, en los experimentos en los que se indica, se utilizaron líneas leucémicas ya establecidas, procedentes de pacientes diagnosticados de LLA-B: TOM1 (ACC578) y NALM6 (ACC128) (DMSZ, Brunswick, Alemania) (Tabla 4). Dichas líneas leucémicas se expandieron en flask de 75 cm<sup>2</sup> en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 2mM de L-glutamina, 100U/ml de penicilina y 1 $\mu$ g/ml de estreptomicina, reemplazándolo cada 6 días.

Para los diferentes experimentos las células se cultivaron a una concentración de  $10^6$  células/ml en el mismo medio usado para su expansión. Los cultivos se realizaron en placas de 24 o 48 pocillos de fondo plano, en un incubador de 37°C, en una atmósfera húmeda y al 5% de CO<sub>2</sub>.

LÍNEA LEUCÉMICA	INMUNOFENOTIPO	ORIGEN	ALTERACIÓN GENÉTICA	RIESGO DE RECAÍDA	FENOTIPO	
					NEGATIVO	POSITIVO
NALM6	LLA pre-B	Establecida en 1976 a partir de sangre periférica de un varón de 19 años diagnosticado de LLA en fase de recaída	No descrita	RB	CD3; CD37 CD80; sm/cyIgG sm/cyIgM; sm/cykappa sm/cylambda	CD10; CD19 CD138; cyCD79a cyIgM; HLA-DR
TOM1	LLA pre-B	Establecida en 1983 a partir de aspirado de médula ósea de una mujer de 54 años diagnosticada de LLA BCR-ABL	t(9;22) BCR-ABL1	RA	CD2; CD3; CD7 CD80; CD138; sm/cyIgG sm/cyIgM; sm/cykappa sm/cylambda	CD10; CD13 CD19; CD20; CD34 CD37; CD38 cyCD79a; HLA-DR

**Tabla 4: Características de las líneas celulares leucémicas.** LLA: Leucemia linfoblástica aguda; RB: Riesgo bajo; RA: Riesgo alto.

En los casos donde se indica se usaron como controles sanos las células stem hematopoyéticas aisladas, mediante el kit específico CD34 MicroBeads Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), a partir de los aspirados de médula ósea de donantes sanos del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (MO-HSCs).

## 5. Aislamiento de células NK de sangre periférica.

Las células NK empleadas en el estudio se aislaron a partir de *buffy coats* obtenidos tras el procesamiento de muestras de sangre periférica de donantes sanos del Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid.

A partir de los concentrados leucocitarios de donantes sanos, previamente diluidos en NaCl 0,9%, se obtuvieron células mononucleares (PBMCs) mediante centrifugación en gradiente de densidad (Lymphocyte Isolation Solution, Rafer, Madrid, España). Seguidamente se aisló la población de células CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> mediante métodos inmunomagnéticos usando el kit específico CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> NK Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec), siguiendo las recomendaciones del fabricante.



## 6. Establecimiento de los cocultivos celulares.

### 6.1. Cocultivos MSCs: células NK.

Los cocultivos de las células NK con las MSCs aisladas de los pacientes se realizaron a una ratio MSC: NK 1:30 (salvo que se indique una ratio diferente) en placas de 24 pocillos de fondo plano, previo cultivo durante 12 horas de las MSCs tanto de donantes sanos como de pacientes pediátricos a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio MesenPRO suplementado con 2mM de L-glutamina, 100u/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomycin. Los cocultivos se llevaron a cabo en 300µL de medio compuesto por MesenPRO y RPMI 1640 (al 50%) suplementado con suero fetal bovino al 10%, 1mM de piruvato sódico, 100u/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomycin y 2mM de L-glutamina. En todos los casos se añadieron las citoquinas IL12 (10 ng/ml) e IL15 (100 ng/ml) (Prospec-Tany TechnoGene Ltd, East Brunkswick, NJ, EEUU /Miltenyi Biotec).

Adicionalmente, en los experimentos en que se indica, los cocultivos se establecieron en presencia o previo tratamiento de las MSCs con alguno de los compuestos que se enumeran a continuación: DAPT, inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa (50µmol/l; Calbiochem, Nottingham, RU); DMH1, inhibidor de la vía de señalización BMP2/4 (10µM; Tocris Bioscience); Noggin, antagonista soluble de la vía de señalización BMP2/4 (500ng/ml); NS-398, inhibidor de la síntesis de PGE2 (5µM; Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, EEUU); BMPRIAFc, receptor soluble de la vía de señalización BMP2/4 (3µg/ml) o el anticuerpo anti-TGF- $\beta$ 1,2,3 (10µg/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU).

En algunos experimentos, las MSCs de donantes sanos fueron previamente cultivadas con las líneas leucémicas NALM6 o TOM1 (tal y como se especifica en el apartado 4), antes de establecer los cocultivos con las células NK.

### 6.2. Cocultivos células NK: células leucémicas.

Por otro lado, se pusieron en cultivo las células NK con las líneas leucémicas NALM6 o TOM1 a diferentes ratios célula NK: célula leucémica en placas de 12 pocillos de fondo plano a una concentración de  $10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, 1mM de piruvato sódico, 100u/ml de penicilina, 100µg/ml de

estreptomycin y 2mM de L-glutamina. En todos los cocultivos se adicionaron las citoquinas IL12 (10ng/ml) e IL15 (100 ng/ml).

Tras 2 o 4 días de cocultivo las células NK se aislaron de las células leucémicas mediante una separación magnética con esferas Dynabeads Biotin Binder (Invitrogen, Life Technologies) previa incubación de las células con el anticuerpo monoclonal anti-CD19 biotina (BioLegend, San Diego, EEUU) diluido en PBS 0,1% BSA (Sigma-Aldrich).

### **6.3. Cocultivos MSCs: células leucémicas.**

En un conjunto de experimentos las líneas leucémicas fueron cultivadas con MSCs de donantes sanos a una ratio MSC: célula leucémica 1:30 ( $30 \cdot 10^5$  células leucémicas/pocillo) en placa de 12 o 24 pocillos de fondo plano en contacto celular o en transwell con tamaño de poro de  $0,4\mu\text{m}$  (Corning-Lonza-Hopkinton). Las MSC-DS se cultivaron previamente solas durante 3 horas en medio MesenPRO suplementado con 2mM de L-glutamina, 100U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomycin. Posteriormente se añadieron las células leucémicas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, 2mM de L-glutamina, 100U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomycin, cultivándose durante 3 días.

## **7. Ensayos de citotoxicidad.**

Las células NK que habían sido cultivadas con las MSCs o con las líneas leucémicas fueron recogidas, tras diferentes periodos de cocultivo según se indica, y usadas como efectoras en ensayos de citotoxicidad contra la línea tumoral K562. Los cocultivos se establecieron en placas de 96 pocillos de fondo plano a diferentes ratios Efecto: Diana en medio RPMI 1640 suplementado con 1% de suero fetal bovino, 100U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomycin. La actividad citolítica de las células NK fue determinada pasadas 4 horas, a partir de la actividad lactato deshidrogenasa detectada en el sobrenadante de los cocultivos, mediante métodos colorimétricos usando el kit no radiactivo Cytotoxicity Detection Kit LDH (Roche Diagnostics, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles máximos y mínimos de dicha actividad enzimática se determinaron mediante cultivo de las células K562 solas y tratadas o no, a las 4 horas, con solución de lisis. El porcentaje de lisis específica fue calculado mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\text{Valor experimental} - \text{Valor mínimo de lisis}}{\text{Valor máximo de lisis} - \text{Valor mínimo de lisis}} \times 100$$

En los experimentos en que se indica, se usaron como células diana para el ensayo de citotoxicidad muestras primarias de pacientes pediátricos con LLA en lugar de la línea tumoral K562. Las condiciones del ensayo fueron las mismas descritas anteriormente.

#### **8. Determinación de la capacidad proliferativa.**

La respuesta proliferativa de las líneas leucémicas NALM6 y TOM1, tras cultivo según las condiciones indicadas en el apartado 3, fue determinada a diferentes tiempos mediante el kit específico 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III (Roche Diagnostics), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para células en suspensión. Durante las 12 horas finales del cultivo se adicionó al medio 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) a una concentración final de 10µM. Tras centrifugar las placas, se recogió el sobrenadante y se secaron durante 2 horas a una temperatura de 65°C. Posteriormente se fijaron con etanol en HCl 0,5M durante 30 minutos a -20°C, se trataron con nucleasas 30 minutos a 37°C y finalmente se incubaron durante otros 30 minutos a 37°C con un anticuerpo anti-BrdU de ratón conjugado a peroxidasa. El revelado se realizó con el sustrato ABTS (ácido 2,2'-Azinobis - [3-etil-benzotiazolin-6] sulfónico) y la absorbancia fue medida usando un lector de ELISA (SUNRISE, Tecan Group Ltd. Männerdorf, Suiza) a 405 nm con una longitud de onda de referencia a 492 nm.

#### **9. Determinación de la viabilidad de las distintas poblaciones celulares.**

La proporción de células apoptóticas en los diferentes cultivos descritos anteriormente se determinó mediante tinción con Anexina-V conjugada con el fluorocromo FITC (Roche Diagnostics), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células de estudio se incubaron durante 30 minutos a 4°C en HEPES en presencia de cantidades saturantes de Anexina-V-Fluos. Los análisis se llevaron a cabo en un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences, San diego, CA, EEUU) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid. Las células necróticas se excluyeron según su tamaño y complejidad, y la captación de yoduro de propidio (IP). Las células apoptóticas se definieron como aquellas Anexina-V positivas dentro de la población yoduro negativo

negativa. En los experimentos en los que se indica, las células se incubaron además con anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos para poder evaluar la viabilidad de las diferentes poblaciones presentes en los cultivos.

Donde se indica, la viabilidad de las células tras los cultivos fue determinada mediante tinción con el colorante Trypan Blue y observación posterior en microscopio óptico.

## **10. Citometría de flujo.**

Para los estudios fenotípicos de las diferentes poblaciones celulares se usaron los anticuerpos recogidos en la Tabla 5.

Para los estudios de expresión de moléculas de membrana, las células fueron incubadas en PBS en presencia de cantidades saturantes de los anticuerpos indicados en cada caso durante 30 minutos a 4°C. Para la detección del receptor BMPRIA se utilizó un anticuerpo purificado específico seguido de una segunda incubación con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de IgG anti-cabra conjugados a fluorocromo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EEUU).

Para la tinción nuclear de la proteína p27, las células fueron fijadas y permeabilizadas con la solución Fixation/Permeabilization (eBiosciences, San Diego, CA, EEUU) y lavadas con Permeabilization Buffer (eBiosciences). Seguidamente fueron incubadas con el anticuerpo anti-p27 combinado con el fluorocromo PE (Santa Cruz Biotechnology) diluido en la solución Permeabilization Buffer durante 30 minutos a 4°C.

El análisis citofluorimétrico se realizó en un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

MOLÉCULA DIANA	CLON	CASA COMERCIAL	FLUOROCROMO
CD14	M5E2	BD Biosciences	FITC
CD16	GRM1	Immunostep	PE-Cy5
CD19	HIB19	BioLegend	PE-Cy5
CD25	BC96	BioLegend	APC
CD29	MAR4	BD Biosciences	APC
CD34	563	BD Biosciences	PE
CD40	5C3	BD Biosciences	FITC
CD44	G44-26	BD Biosciences	FITC
CD56	B159	Miltenyi Biotec	PE
CD69	FN50	BD Biosciences	FITC
CD86	IT2.2	BioLegend	PE-Cy5
CD90	5E10	BioLegend	Alexa Fluor 647
CD94	DX22	BioLegend	Alexa Fluor 647
HLA-A,B,C	W6-732	BioLegend	FITC
HLA-E	3D12	BioLegend	PE
HLA-G	87G	BioLegend	PE
HLA-DR	G46-6	BD Biosciences	APC
NKp30/CD337	P30-15	BioLegend	Alexa Fluor 647
NKp44/CD336	P44-8	BioLegend	Alexa Fluor 647
NKp46/CD335	9E2	BioLegend	Alexa Fluor 647
NKG2A	131411	R&D Systems	PE
NKG2D/CD314	1D11	BioLegend	APC
KIR2DL2L3/CD158b	DX27	BioLegend	PE
KIR3DL1/CD158e1	DX9	BioLegend	PE
PD-L1/CD274	29E.2A3	BioLegend	APC
PD-L2/CD273	24F.10C12	BioLegend	PE
p27	F-8	Santa Cruz	PE
BMPRI1A/ALK-3	policlonal	R&D Systems	purificado

**Tabla 5: Anticuerpos usados para citometría de flujo.**

### 11. Análisis por PCR cuantitativa.

Para el aislamiento y purificación de ARN se usó el kit Absolutely RNA MicroPrep (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, EEUU) en el que se incluye, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, un paso de digestión con ADNasa I para eliminar la contaminación por ADN genómico. El ADN complementario (ADNc) fue sintetizado usando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

<i>BMPR1A</i>	Hs01034909_g1	<i>BMPR1B</i>	Hs00176144_m1
<i>ACRV1A</i>	Hs00153836_m1	<i>BAMBI</i>	Hs00180818_m1
<i>BMP4</i>	Hs00370078_m1	<i>SMAD1</i>	Hs00195432_m1
<i>SMAD4</i>	Hs00929647_m1	<i>SMAD6</i>	Hs00178579_m1
<i>SMAD7</i>	Hs00998193_m1	<i>NOG</i>	Hs00271352_s1
<i>CHRD</i>	Hs00415315_m1	<i>TWSG1</i>	Hs00221028_m1
<i>ID1</i>	Hs00357821_g1	<i>ID2</i>	Hs00747379_m1
<i>ID3</i>	Hs00171409_m1	<i>GRZMA</i>	Hs00989184_m1
<i>PRF1</i>	Hs00169473_m1	<i>IL15</i>	Hs01003716_m1
<i>PI9</i>	Hs00244603_m1	<i>CCL5</i>	Hs00174575_m1
<i>CXCL10</i>	Hs01124251_g1	<i>TLR3</i>	Hs00152833_m1
<i>TLR4</i>	Hs00152939_m1	<i>JAG1</i>	Hs01070032_m1
<i>JAG2</i>	Hs00171432_m1	<i>MICB</i>	Hs00792195_m1
<i>ULBP3</i>	Hs00225909_m1	<i>B7H6</i>	Hs02340611_m1
<i>GNB2L1</i>	Hs00272002_m1		

**Tabla 6: Ensayos TaqMan empleados para el estudio por PCR cuantitativa.**

El ADNc obtenido fue empleado para el estudio por PCR cuantitativa de diferentes genes usando los ensayos TaqMan que se muestran en la Tabla 6. Los diferentes genes se normalizaron usando como control endógeno el gen *GNB2L1* (Applied Biosystems). Todas las qPCRs se realizaron por duplicado usando el TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones, detecciones y análisis fueron realizados en un 7.900 HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, Universidad Complutense de Madrid).

## **12. Determinación de factores solubles en los sobrenadantes.**

Los sobrenadantes de los cultivos fueron recogidos en los tiempos indicados en cada caso y congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. La determinación de las concentraciones de IL8, IL10, TNF $\alpha$  (todos ELISA MAX Standard Sets, BioLegend), IFN $\gamma$  (BioLegend y R&D Systems), PGE2 (R&D Systems) y BMP4 (DuoSet ELISA, R&D Systems) se hizo mediante la técnica de ELISA usando un lector SUNRISE (Tecan Group Ltd. Männerdorf, Suiza) a una absorbancia de 450nm y siguiendo las instrucciones del fabricante. Asimismo, las concentraciones de IL6, CCL2 (MCP-1) y TGF- $\beta$  se cuantificaron mediante el sistema Cytometric Bead Array Flex set (BD Biosciences) utilizando para el análisis un citómetro de flujo FACScalibur (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, UCM). TGF- $\beta$  se cuantificó también mediante la técnica de ELISA Multiplex, junto con otras moléculas solubles como IL7, VEGF y CXCL12 (SDF-1), usando un analizador LUMINEX 100<sup>TM</sup> (Hospital Universitario del Niño Jesús).

## **13. Análisis estadístico.**

Para el estudio de variables cuantitativas con un tamaño muestral pequeño se aplicó la prueba paramétrica T de Student, con los siguientes niveles de significación: \*/#  $p \leq 0,05$ ; \*\*/##  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*/###  $p \leq 0,001$ .

La prueba no paramétrica de suma de rangos (de Wilcoxon) se utilizó para comparar las variables cuantitativas. Las curvas de supervivencia se calcularon según el modelo Kaplan Meier, y las comparaciones entre curvas se realizaron según el modelo de Cox. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas con \* $p \leq 0,05$ . Las variables estudiadas se recogieron en una base de datos y se analizaron utilizando el paquete estadístico Stata / IC 11,0 (College Station, TX, EE.UU.).

## **RESULTADOS**



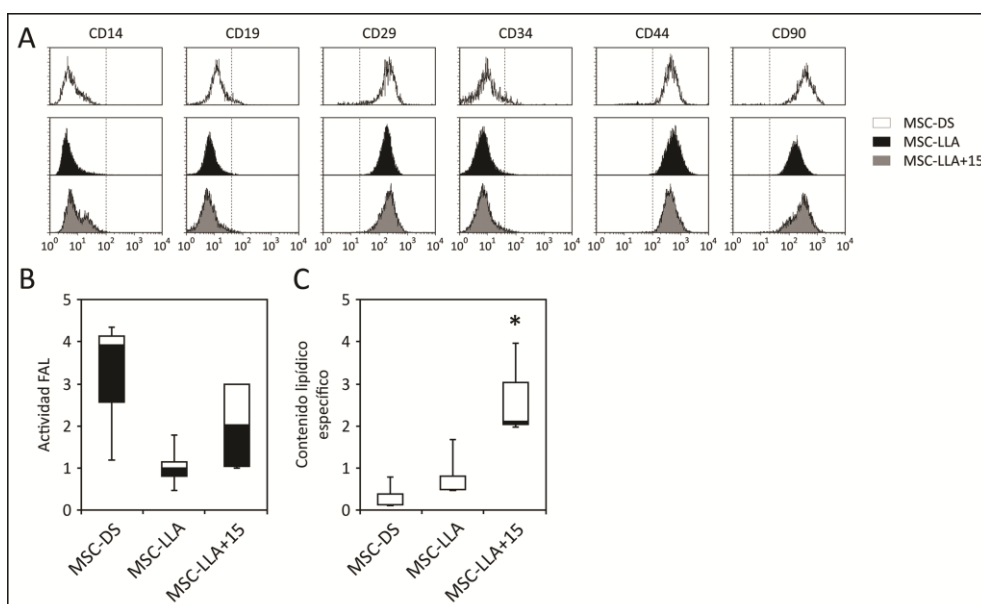


# 1. CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE RIESGO BAJO/INTERMEDIO PROMUEVEN LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LAS CÉLULAS NK.

Las MSCs se han descrito como células de morfología fibroblastoide, con capacidad para adherirse al plástico y función inmunosupresora, es decir, con capacidad para bloquear la acción de las células del sistema inmunitario <sup>54</sup>.

En nuestro estudio hemos trabajado con MSCs aisladas de pacientes pediátricos con LLA, en el momento del diagnóstico (MSC-LLA) y a distintos tiempos a lo largo del tratamiento quimioterápico: 15 días (MSC-LLA+15) y 35 días (MSC-LLA+35).

Las MSCs derivadas de pacientes con LLA presentaban las características típicas definidas previamente para este tipo celular por la Asociación Internacional de Terapia Celular <sup>54</sup>. Como se muestra en la Figura 8A, no se encontraron diferencias en cuanto a la expresión de marcadores característicos de esta estirpe celular como CD29 o CD90, entre las MSC-LLA y las de donantes sanos, siendo además ambas negativas para marcadores hematopoyéticos. Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas en su capacidad de diferenciación osteogénica (Figura 8B) o adipogénica (Figura 8C), si bien en el segundo caso las MSCs aisladas de los pacientes con LLA a los 15 días de iniciar el tratamiento quimioterápico mostraban una tendencia a aumentar dicha capacidad.



**Figura 8: Patrón de expresión de marcadores de superficie y capacidad de diferenciación de MSCs de donantes sanos y de pacientes con LLA.** MSCs fueron cultivadas en ausencia de estímulo durante 6 días. (A) Análisis por citometría de flujo de los marcadores típicos de dichas células y de marcadores hematopoyéticos, tras el tiempo indicado. Los histogramas representan el porcentaje de células positivas para cada marcador en MSCs de donantes sanos y de pacientes en el momento del diagnóstico y a los 15 días tras iniciarse el tratamiento quimioterápico. Los datos mostrados son representativos de 8 donantes sanos y 9 pacientes con LLA (B-C) Estudio de la capacidad de diferenciación de las MSCs de donantes sanos y de pacientes en el momento del diagnóstico y a los 15 días de iniciar el tratamiento quimioterápico. Tras los 6 días de cultivo iniciales, las células fueron transferidas a un medio específico para inducir su diferenciación osteogénica (B) o adipogénica (C) durante 15-20 días. La diferenciación osteogénica fue evaluada en términos de actividad de la fosfatasa alcalina en 50µl de lisado celular y normalizada al contenido total de proteína. La diferenciación adipogénica se evaluó mediante tinción con Oil Red O (ORO) y azul de Coomassie. La ratio absorbancia ORO/absorbancia Azul de Coomassie determinó el contenido específico de lípidos. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar de 6 donantes sanos y 11 pacientes con LLA. (\* $p \leq 0,05$ ; comparación frente a MSC-DS).

### 1.1. Las MSCs derivadas de pacientes pediátricos con LLA incrementan la capacidad citolítica de las células NK.

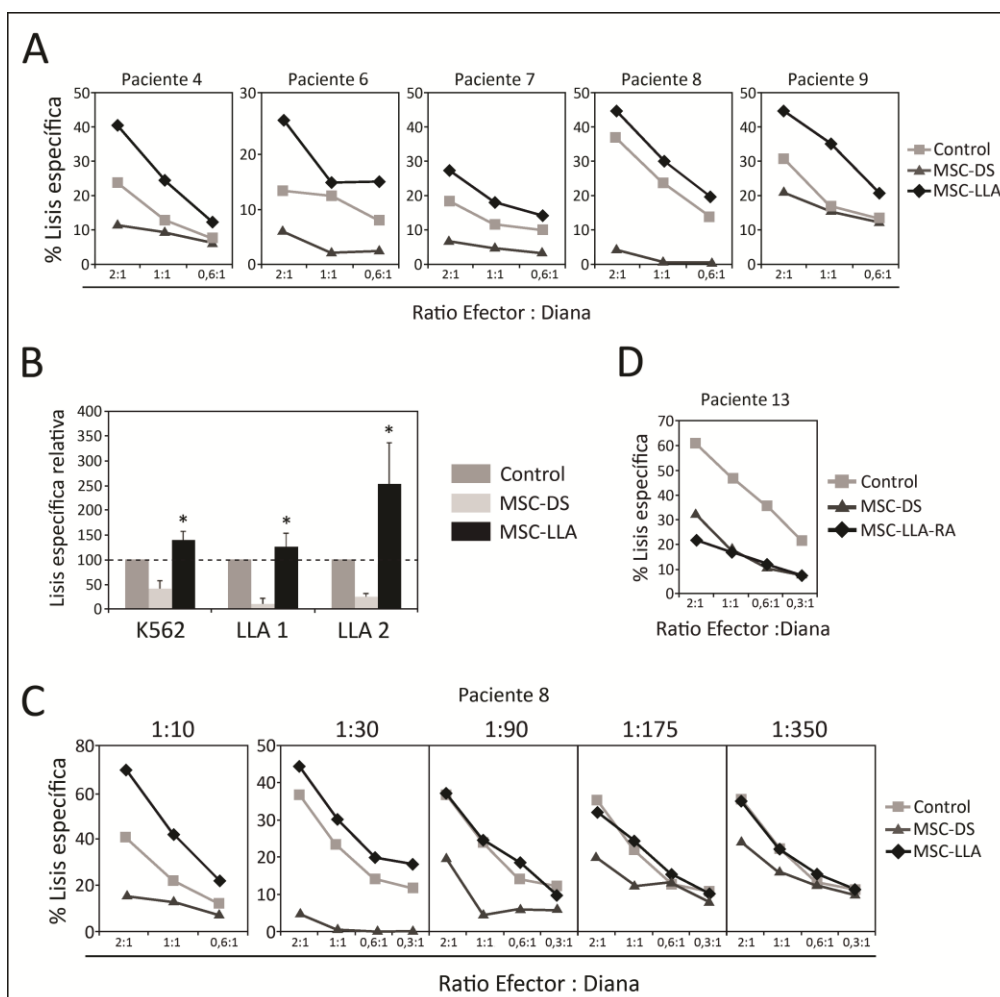
El primer objetivo que nos planteamos fue analizar los efectos de las MSCs sobre el sistema inmunitario, concretamente sobre las células NK, principales efectores antitumorales del organismo. Para ello, las células NK fueron cultivadas con las MSC-DS o con las MSC-LLA durante 36 horas en presencia de las citoquinas IL12 e IL15 y, posteriormente enfrentadas a la línea tumoral K562 para determinar su capacidad lítica. Como se muestra en la Figura 9A, las células NK que habían sido cultivadas con las MSCs de donantes sanos presentaban, como había sido descrito previamente<sup>180-182</sup>, una capacidad lítica significativamente disminuida; por el contrario, aquellas que se habían cultivado junto a las MSCs derivadas de pacientes de bajo/intermedio riesgo presentaban un incremento significativo de dicha capacidad, incluso por encima de la exhibida por las células NK cultivadas exclusivamente con las citoquinas.

Estos resultados fueron corroborados en ensayos de citotoxicidad frente a células leucémicas primarias de pacientes pediátricos donde, de nuevo, aquellas células NK que se habían cultivado previamente en presencia de las MSC-LLA fueron más eficaces para lisar las células tumorales (Figura 9B).

Como se observa en la Figura 9C, el efecto inmunopotenciador ejercido por las MSC-LLA sobre la actividad citolítica de las células NK fue dosis dependiente. Así, su efecto inmunoestimulador se reducía progresivamente cuando la ratio MSC: NK disminuía. Como

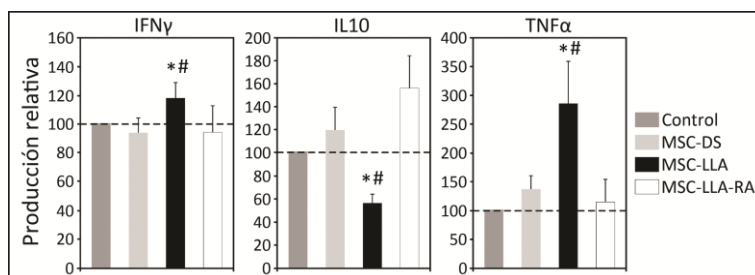
cabía esperar, en paralelo, el efecto inmunosupresor ejercido por las MSCs de donantes sanos también se reducía al disminuir la proporción de MSCs en los cultivos.

Para conocer si también las MSCs derivadas de pacientes de LLA de alto riesgo presentaban un comportamiento inmunoestimulador, se establecieron cocultivos en las mismas condiciones antes indicadas con MSCs aisladas de pacientes con elevado riesgo de recaída según protocolo. En contraste a lo observado anteriormente, el comportamiento de estas MSCs fue similar al de MSCs de donantes sanos, como se muestra en la Figura 9D.



**Figura 9: MSCs aisladas de pacientes con LLA incrementan la capacidad citotóxica de células NK.** Células NK aisladas de sangre periférica de donantes sanos fueron cocultivadas durante 12 horas en medio suplementado con IL12 (10ng/ml) e IL15 (100ng/ml) en presencia o ausencia de MSC-LLA o MSC-DS (Ratio MSC: NK 1:30). (A) Tras este periodo, las células NK se aislaron de los cultivos y su actividad citotóxica fue evaluada en un ensayo contra la línea tumoral K562 en diferentes ratios célula efectora-célula blanco. Se muestran los datos representativos de 5 pacientes diferentes diagnosticados de LLA de riesgo bajo o intermedio y 5 donantes sanos (pacientes n=11; donantes sanos n=8). (B) Estudio de la capacidad citotóxica de las células NK en las mismas condiciones descritas anteriormente, usando como células diana células leucémicas primarias aisladas de dos pacientes diagnosticados de LLA (Ratio Efectora:Diana 2:1). La gráfica muestra la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de lisis específica de células NK tras contacto con MSC-DS o MSC-LLA respecto a la de células NK cultivadas solas (100%). Para el estudio se usaron células NK de tres donantes diferentes y se cocultivaron con MSCs de dos donantes sanos y de dos pacientes pediátricos con LLA. (\* $p \leq 0,05$ ; comparación frente a MSC-DS). (C) Actividad citotóxica de células NK tras cocultivo con diferentes ratios de MSC-DS o MSC-LLA (1:10–1:350; MSC: NK). Se muestra un experimento representativo de cuatro experimentos independientes, en los que se usaron cuatro pacientes diagnosticados de LLA y cuatro donantes sanos. (D) Actividad citolítica de células NK tras cocultivo con MSC-LLA-RA. Los datos mostrados son representativos de dos pacientes diagnosticados de LLA con alto riesgo de recaída y cinco donantes sanos.

El estudio funcional de las células NK se completó con el análisis de los niveles de producción de diferentes citoquinas mediante técnicas de ELISA. En correlación con los resultados anteriores, se observó un incremento significativo de los niveles de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , y una reducción de los de IL10, producidos por las células NK que se cultivaron en presencia de MSC-LLA (Figura 10).

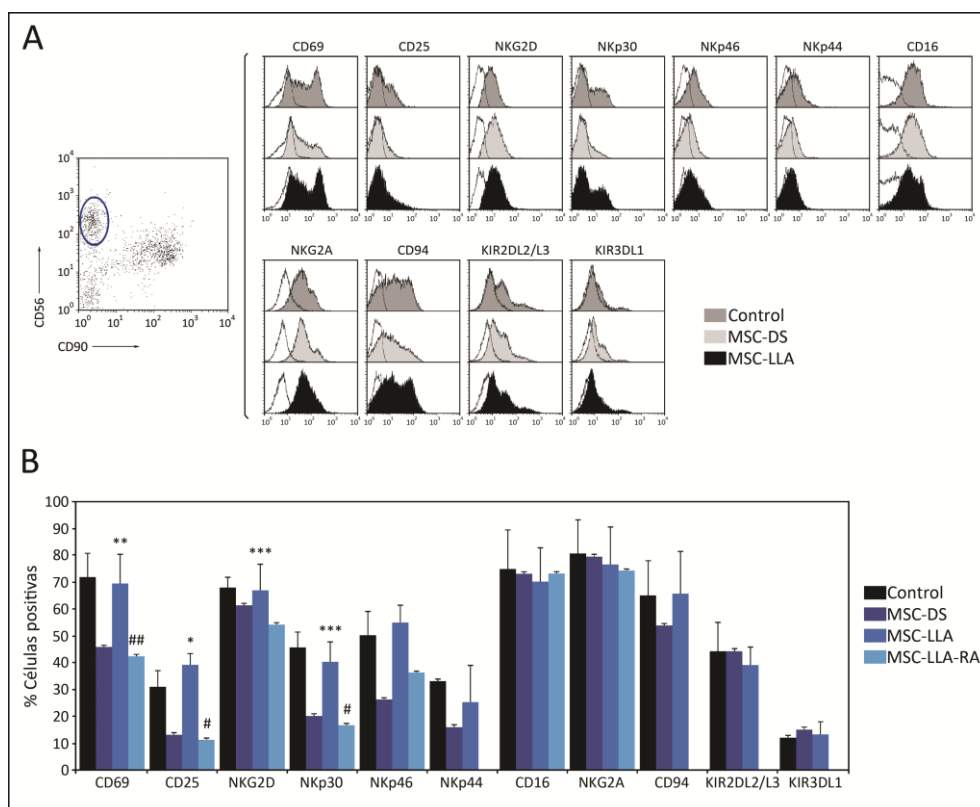


**Figura 10: La presencia de MSCs de pacientes con LLA modifica el patrón de producción de citoquinas de las células NK.** Células NK aisladas de donantes sanos fueron cultivadas solas o en presencia de MSC-DS, MSC-LLA o MSC-LLA-RA. Tras 36 horas de cocultivo, se recogieron los sobrenadantes y se analizó mediante ELISA la concentración de IFN $\gamma$ , IL10 y TNF $\alpha$ . Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar de la concentración de las diferentes citoquinas, referida a la producida por células NK cultivadas en condiciones control (valor control, 100; \* $p \leq 0,05$ ; comparación MSC-LLA y MSC-LLA-RA frente a MSC-DS. # $p \leq 0,05$ ; comparación MSC-LLA y MSC-LLA-RA frente a cultivos de células NK control; n= 8-13 experimentos independientes).

## 1.2. Las MSCs de pacientes con LLA no inhiben la regulación positiva de moléculas activadoras en las células NK.

A continuación analizamos si los cambios funcionales que sufrían las células NK tras contacto con las MSCs de los pacientes de LLA reflejaban modificaciones en la expresión de receptores de activación y/o inhibición de las primeras.

El estudio por citometría de flujo de los diferentes receptores indicó que la presencia de las MSCs de los pacientes con LLA incrementaba la expresión de las moléculas de activación CD69 y CD25, así como de los receptores de activación propios de las células NK, NKp30 y NKG2D, alcanzándose niveles similares a los exhibidos por las NK activadas, cultivadas solas (Figura 11A). Por el contrario y, en consonancia con los resultados obtenidos en el estudio de citotoxicidad, no se observó dicha regulación positiva en las células NK cultivadas con las MSC de donantes sanos ni en aquellas que habían estado en contacto con las MSC aisladas de pacientes con riesgo alto de recaída (Figura 11B).

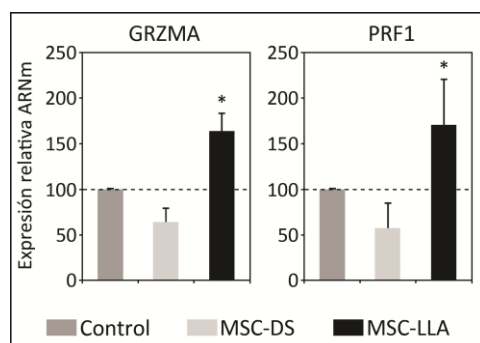


**Figura 11: Estudio del perfil fenotípico de células NK tras contacto con MSCs de donantes sanos o de pacientes con LLA.** Análisis por citometría de flujo de la expresión de los diferentes marcadores relacionados con la funcionalidad de las células NK tras cultivo con IL12 (10ng/ml) e IL15 (100ng/ml) durante 36 horas en presencia o ausencia de MSC-DS o MSC-LLA. (A) Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para cada marcador arriba indicado. Se muestra un experimento representativo de ocho experimentos diferentes con un total de ocho muestras de MSCs de pacientes con LLA y siete de donantes sanos. En todos los casos el histograma en blanco corresponde al control de isotipo. (B) Se muestra el porcentaje de células positivas para los diferentes marcadores analizados. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de los ocho experimentos diferentes anteriormente indicados y de dos en el caso de las MSCs derivadas de pacientes de LLA de alto riesgo. (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; comparación células NK cultivadas con MSC-LLA y MSC-LLA-RA frente a células NK cultivadas con MSC-DS; # $p \leq 0,05$ ; ## $p \leq 0,01$ ; comparación células NK cultivadas con MSC-LLA y MSC-LLA-RA frente a las cultivadas solas en condiciones control).

### 1.3. Las células NK cultivadas con MSCs de pacientes con LLA expresan mayores niveles de granzima y perforina.

Puesto que las células NK cultivadas en presencia de MSC-LLA presentaban una capacidad funcional incrementada, respecto a las células NK cultivadas con las MSC-DS, estudiamos a continuación la expresión génica de granzima y perforina, proteínas mediadoras de la lisis celular.

En línea con lo observado hasta ahora, las células NK tras contacto con las MSC-LLA, incrementaban los niveles de expresión de ARN mensajero de ambas proteínas presentes en los gránulos citotóxicos incluso, por encima de los valores obtenidos para NK activadas y cultivadas solas (Figura 12).



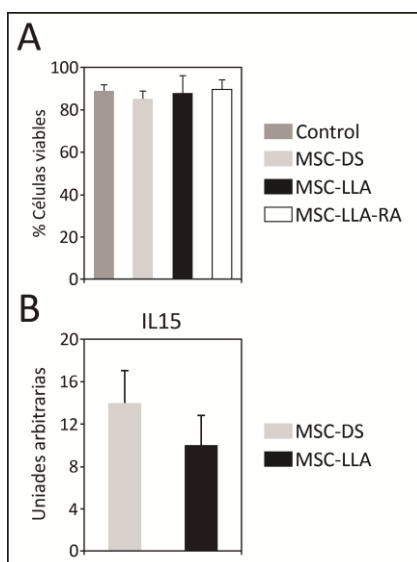
**Figura 12: Las células NK incrementan la expresión de granzima y perforina tras contacto con MSCs de pacientes con LLA.** Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de expresión de granzima (GRZMA) y perforina (PRF1) en células NK tras cultivo solas, o en presencia de MSC-DS o MSC-LLA. Los niveles de expresión fueron normalizados a la expresión de GNB2L1. Los datos que se muestran están referidos a los niveles de expresión de ambos genes en las células NK cultivadas en condiciones control (valor control, 100). Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. (\* $p \leq 0,05$ , comparación frente a células NK cultivadas en presencia de MSCs de donantes sanos).

#### 1.4. La viabilidad de las células NK no se ve modificada tras cultivo con las MSCs procedentes de donantes sanos ni de pacientes con LLA.

Finalmente, para conocer si los cambios observados en la capacidad funcional de las células NK tras contacto con MSCs de pacientes con LLA eran debidos a un efecto de estas células sobre la supervivencia de las primeras, diferente al que podrían ejercer las MSCs de donantes sanos, se estudió su viabilidad mediante tinción con Anexina V-ioduro de propidio.

El análisis mediante citometría de flujo determinó que la presencia de las MSCs, independientemente de su procedencia, no modificaba de manera significativa el porcentaje de células NK viables en los cultivos (Figura 13A).

En relación a estos resultados, los niveles de expresión del mensajero para IL15, citoquina implicada en la supervivencia de las células NK, fueron similares en MSCs derivadas de donantes sanos y de pacientes de LLA (Figura 13B).



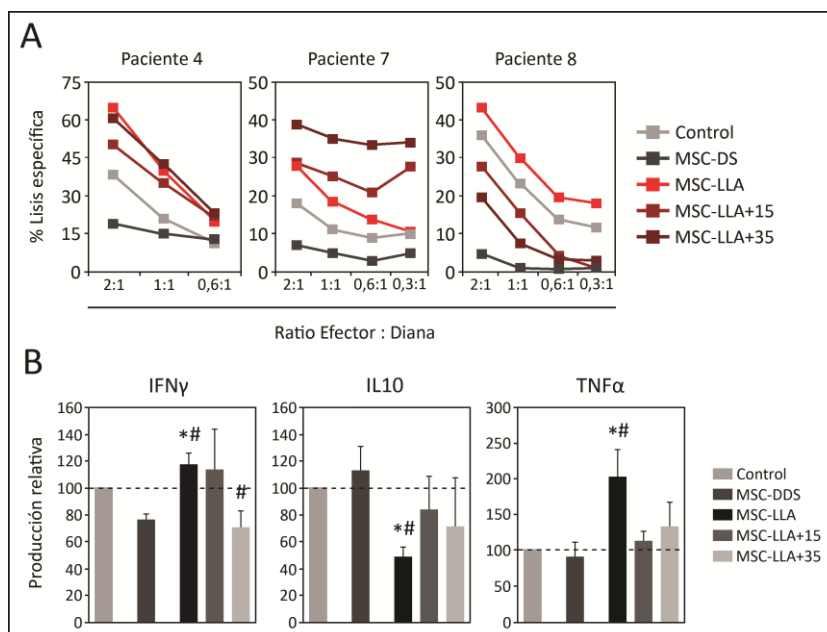
**Figura 13: La presencia de MSCs de pacientes con LLA no modifica la viabilidad de las células NK.** (A) Estudio mediante tinción con Anexina V 3 ioduro de propidio de la viabilidad de las células NK cultivadas solas o tras contacto con MSC-DS o MSC-LLA. Se definieron como viables aquellas células Anexina<sup>-</sup> IP<sup>-</sup>. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de dos a ocho experimentos diferentes. (B) Análisis por PCRq de los niveles de expresión de la citoquina IL15 en MSC-DS y MSC-LLA. Dichos niveles se normalizaron frente al endógeno GNB2L1. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de cinco experimentos independientes con un total de seis muestras de MSCs de pacientes con LLA y tres muestras de donantes sanos.



### **1.5. Las MSCs aisladas de pacientes en tratamiento quimioterápico recuperan las propiedades inmunomoduladoras características de las MSCs de donantes sanos.**

A continuación se estudió si la diferente capacidad inmunomoduladora observada en las MSC derivadas de pacientes con LLA al diagnóstico respecto a las MSCs de donantes sanos, se mantenía a lo largo del tratamiento de la enfermedad.

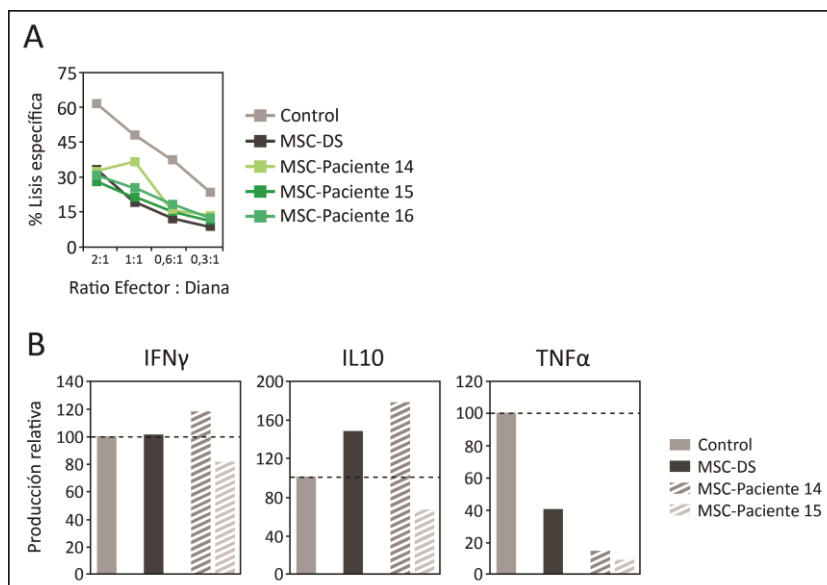
Se aislaron las MSCs de los mismos pacientes de LLA a 15 días y 35 días tras iniciarse el tratamiento quimioterápico, y se enfrentaron a las células NK en las mismas condiciones descritas en el primer apartado. Tanto el análisis de la capacidad citolítica de las células NK (Figura 14A) como el estudio de los niveles de producción de las diferentes citoquinas (Figura 14B) tras contacto con las diferentes MSCs, sugería una recuperación de la capacidad inmunosupresora característica de las MSCs de donantes sanos. Cabe destacar sin embargo, que esta recuperación de la funcionalidad de las MSCs parece ser alcanzada a diferentes tiempos en los distintos pacientes, como se refleja en la Figura 14A. Si bien en algunos pacientes (ejemplo paciente 8) la adquisición de la capacidad inmunosupresora era progresiva a medida que se avanzaba en el tratamiento, en otros pacientes apenas se veía modificada respecto a las MSCs del diagnóstico (ejemplo paciente 4) y, en otros casos, la capacidad inmunopotenciadora era incluso mayor cuando se utilizaban en el cultivo MSCs de pacientes de LLA en tratamiento (+15 y +35) que aquellas derivadas del mismo paciente al diagnóstico (ejemplo paciente 7). Esta heterogeneidad en el comportamiento inmunomodulador de las MSCs podría deberse a un efecto dependiente de individuo de los agentes quimioterápicos sobre el microambiente medular, siendo en cada uno de ellos diferente la cinética de renovación celular.



**Figura 14: Efecto del cocultivo de MSCs de pacientes con LLA en tratamiento quimioterápico sobre la funcionalidad de las células NK.** Cultivo durante 12 (ensayos de citotoxicidad) o 36 horas (evaluación de los niveles de citocinas) de células NK con MSC-LLA aisladas en distintos momentos de la enfermedad: diagnóstico, 15 y 35 días tras iniciarse el tratamiento quimioterápico. (A) Tras este periodo, las células NK se aislaron de los cultivos y su actividad citotóxica fue evaluada en un ensayo contra la línea tumoral K562 en diferentes ratios célula efectora: célula blanco. La gráfica muestra el porcentaje de lisis específica medido en base a la actividad de la enzima LDH obtenidos con tres pacientes con LLA de un total de once testados. (B) Sobrenadantes de los cocultivos antes mencionados fueron recogidos y usados para determinar mediante ELISA las concentraciones de IFN $\gamma$ , IL10 y TNF $\alpha$ . Los datos mostrados están referidos a los niveles de producción de citoquinas por las células NK cultivadas en condiciones control (valor control, 100). Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de ocho muestras de donantes sanos y seis muestras de pacientes con LLA. (\* $p \leq 0,05$ ; comparación frente a MSC-DS; # $p \leq 0,05$ ; comparación frente a células NK en condiciones control).

Continuando con el planteamiento de que progresivamente con el tratamiento quimioterápico, las MSCs aisladas de los pacientes con LLA eran capaces de recuperar las propiedades inmunosupresoras exhibidas por las MSCs de los donantes sanos, se estudió el comportamiento de las MSCs aisladas de pacientes ya recuperados, al menos un año después de terminar el tratamiento. Como puede observarse en la Figura 15, estas MSCs reducían la capacidad funcional de las células NK de manera similar a como lo hacían las MSCs de donantes sanos.

En conjunto, estos resultados indican que, una vez erradicada la enfermedad y finalizado el tratamiento, las MSCs presentes en el nicho medular presentan características inmunosupresoras similares a las de los donantes sanos.



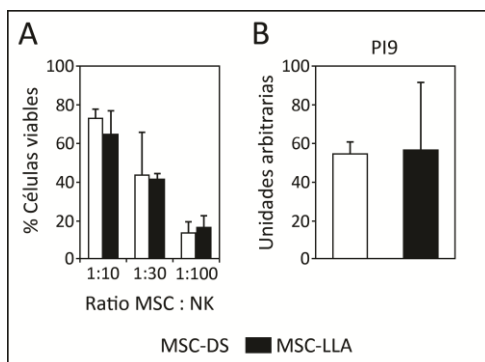
**Figura 15: Comportamiento inmunosupresor de las MSCs de pacientes con LLA ya recuperados y fuera de tratamiento.** Cocultivo durante 12 horas, en presencia de IL12 (10ng/ml) e IL15 (100ng/ml) de células NK con MSCs de tres pacientes pediátricos ya recuperados y fuera de tratamiento quimioterápico. (A) Tras este periodo, las células NK se aislaron de los cultivos y su actividad citotóxica fue evaluada en un ensayo contra la línea tumoral K562 en diferentes ratios célula efectora/célula diana. La gráfica muestra el porcentaje de lisis específica medido en base a la actividad de la enzima LDH. (B) Determinación mediante ELISA de la concentración de IFN $\gamma$ , IL10 y TNF $\alpha$  en los cocultivos descritos anteriormente. Los datos están referidos a los valores de producción de las células NK en condiciones control (valor control, 100).

#### 1.6. Las MSCs de donantes sanos y de pacientes pediátricos con LLA presentan la misma susceptibilidad a la lisis mediada por las células NK.

Una diferente susceptibilidad de las MSCs de donantes sanos y de los pacientes con LLA a la lisis mediada por las células NK podría explicar los cambios observados hasta ahora en la función inmunomoduladora. Por ello estudiamos la viabilidad de las primeras tras contacto con las células NK a diferentes ratios MSC: célula NK, mediante tinción con Anexina V-ioduro de propidio. Como se muestra en la Figura 16A, el porcentaje de células MSCs viables se reducía a medida que incrementábamos el número de células NK en los cocultivos, sin observarse diferencias entre las MSCs de donantes sanos y de pacientes.

Se determinaron también los niveles de ARN mensajero de PI9, serpina que inhibe la acción de la granzima B liberada por las células NK. En línea con los resultados anteriores, los niveles de expresión de esta proteína fueron similares en todas las muestras de MSCs evaluadas, tanto de donantes sanos como de pacientes con LLA, sugiriendo una capacidad

equivalente de protección de las mismas frente a la lisis mediada por las células NK (Figura 16B).

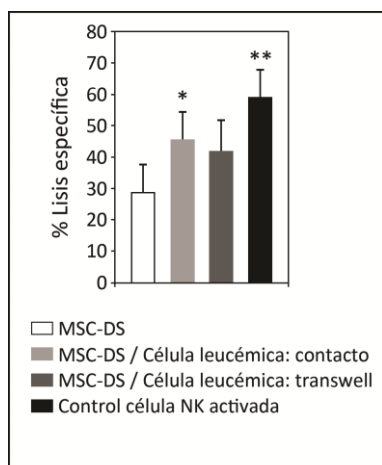


**Figura 16: Las MSCs de donantes sanos y de pacientes con LLA presentan una similar susceptibilidad a la lisis mediada por células NK.** (A) Estudio de la viabilidad de MSC-DS y MSC-LLA tras cocultivo durante 12 horas con diferentes ratios de células NK. Se muestra la media del porcentaje de MSC-DS y MSC-LLA  $Anexina^{-} IP^{-}$  de siete experimentos independientes con un total de cinco muestras de pacientes con LLA y tres muestras de donantes sanos. (B) Análisis por PCRq de la expresión de la serpin PI9 en MSC-DS y MSC-LLA. Los niveles de expresión fueron normalizados al endógeno GNB2L1. La gráfica muestra la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

## 2. LAS MSCs RESPONDEN A LA PRESENCIA DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS MODIFICANDO SUS PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS.

### 2.1. Las MSCs derivadas de donantes sanos adoptan características inmunomoduladoras de MSCs de pacientes con LLA cuando se exponen a células leucémicas.

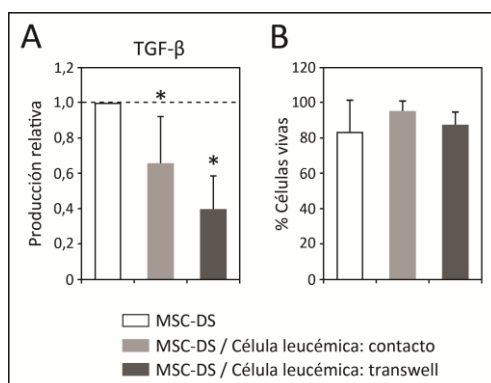
A continuación analizamos si la adquisición de las características immunoestimuladoras mostradas por las MSCs de los pacientes con LLA al diagnóstico era una consecuencia directa de la presencia de las células leucémicas. Para ello se pusieron en cultivo MSCs de donantes sanos con la línea celular de leucemia linfoblástica tipo B, NALM6 (catalogada de riesgo bajo de recaída) y, tras tres días de cultivo, en contacto celular o en transwell, se recogieron las MSCs y se volvieron a cultivar con células NK durante 36 horas. Como habíamos descrito previamente, las MSCs de donantes sanos inhibieron la actividad citotóxica de las células NK. Sin embargo, cuando estas mismas MSCs de donantes sanos habían sido previamente cocultivadas con células de la línea NALM-6, las células NK exhibían una actividad lítica similar a aquella mostrada por las células NK cultivadas solas. Similares, aunque menos evidentes, fueron los resultados obtenidos cuando el contacto MSC-célula leucémica estaba impedido mediante un sistema de transwell (Figura 17).



**Figura 17: MSCs de donantes sanos modifican sus propiedades immunoestimuladoras como respuesta a la presencia de células leucémicas.** MSC-DS fueron cultivadas con la línea leucémica NALM-6 (Ratio MSC: célula leucémica, 1:30) en contacto celular o en transwell. Pasados 3 días, las MSC se cultivaron con células NK de tres donantes diferentes y se analizó la capacidad citotóxica de estas últimas frente a la línea tumoral K562 (Ratio célula efectora: célula diana, 2:1). La gráfica representa la media ± desviación estándar de muestras de MSCs de tres donantes sanos (\*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01; comparación frente a MSC-DS; no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon MSC-DS/célula leucémica-en contacto o transwell frente a células NK cultivadas solas; tampoco se hallaron diferencias significativas en los porcentajes de lisis obtenidos entre las células NK en presencia de MSCs previamente cultivadas en contacto o en transwell con las células leucémicas).

Para evaluar cuáles podrían ser los mecanismos que subyacen a la pérdida del potencial inmunosupresor de las MSC-DS en presencia de las células leucémicas, se analizaron los

niveles de TGF- $\beta$ , potente agente inmunosupresor, tras el cultivo de las MSC-DS con la línea NALM6. Como se muestra en la Figura 18A, la presencia de las células leucémicas redujo de manera significativa los niveles de TGF- $\beta$  presentes en el sobrenadante de los cocultivos, no debiéndose dicha reducción a un descenso en la viabilidad de las MSCs a causa de la presencia de la leucemia (Figura 18B).



**Figura 18: La presencia de las células leucémicas reduce la producción de TGF- $\beta$  por las MSCs de donantes sanos.** MSC-DS fueron cultivadas durante 3 días con la línea leucémica NALM6 (Ratio MSC: célula leucémica, 1:30), en contacto celular o en transwell. (A) Análisis de los niveles de TGF- $\beta$  en el sobrenadante de los cocultivos mediante CBA. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes, de la concentración de TGF- $\beta$  referida a la producida por las MSC-DS en condiciones control -1- (\* $p \leq 0,05$ ; comparación frente a MSC-DS). (B) Estudio de la viabilidad de las MSC-DS tras cultivo con las células leucémicas, determinada mediante tinción con el colorante Trypan Blue. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de células vivas de seis experimentos independientes.

### **3. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN EL CAMBIO DE LAS PROPIEDADES INMUNOMODULADORAS DE LAS MSCs.**

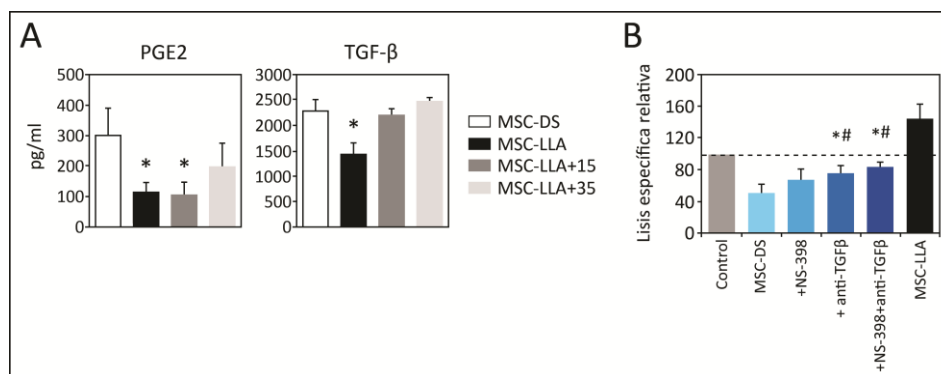
Hoy en día se asume que a las propiedades inmunosupresoras de las MSCs contribuyen tanto factores solubles como contactos célula-célula. Por ello, y a la vista de los resultados anteriores, nos planteamos analizar los posibles mecanismos implicados en el cambio de las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs de pacientes con LLA.

#### **3.1. Las MSCs de los pacientes con LLA reducen la producción de TGF- $\beta$ en relación a las MSCs de donantes sanos.**

Puesto que la producción de TGF- $\beta$  se encontraba reducida en los cultivos de las MSC-DS tras contacto con la leucemia, comprometiendo así su función inmunosupresora, nos planteamos si también estaría modificada en las MSCs de los pacientes.

Como se muestra en la Figura 19A, la producción tanto de TGF- $\beta$  como de PGE2, otro agente inmunosupresor, estaba significativamente reducida en los sobrenadantes de cultivos de MSC-LLA respecto a aquellos de donantes sanos. Dicha disminución fue mucho menos acusada en los cultivos de MSCs derivadas de pacientes ya en tratamiento, acercándose en el caso de las MSC-LLA+35 a los valores exhibidos por las MSCs de donantes sanos.

Para conocer la contribución de ambas moléculas al comportamiento inmunosupresor exhibido por las MSCs, MSCs derivadas de donantes sanos fueron pretratadas con anti-TGF- $\beta$  o con el inhibidor de la síntesis de PGE2 NS-398, previo a su cultivo con las células NK. Sólo el bloqueo de la actividad TGF- $\beta$  inhibió significativamente la capacidad inmunosupresora de las MSC-DS, si bien no se llegaron a alcanzar los efectos inmunoestimuladores de las MSC-LLA, lo que sugería la implicación de otros mecanismos adicionales (Figura 19B).



**Figura 19: Factores solubles que median las propiedades inmunomoduladoras de las MSC-LLA.** (A) MSC-DS y MSC-LLA aisladas en diferentes momentos de la enfermedad fueron cultivadas en ausencia de estímulo durante seis días. Posteriormente se recogieron los sobrenadantes y se analizaron los niveles de PGE2 y TGF-β mediante ELISA y CBA, respectivamente. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de seis muestras de MSC-DS y entre siete y diez muestras de MSC-LLA. (B) Células NK cultivadas en presencia de IL12 (10ng/ml) e IL15 (100ng/ml) solas o con MSC-DS o MSC-LLA (Ratio MSC: NK 1:30) tratadas con NS-398 (inhibidor de PGE2) y/o anti-TGF-β. Tras 36 horas se analizó su capacidad citotóxica frente a la línea tumoral K562, medida en base a los niveles de la enzima LDH presente en el sobrenadante de los cocultivos. La gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos diferentes que incluían cuatro muestras MSC-DS y tres muestras MSC-LLA. Los datos están referidos a la lisis específica de las células NK cultivadas únicamente en presencia de las citoquinas (valor control, 100; \* $p \leq 0,05$ ; comparación frente a MSC-DS; # $p \leq 0,05$ ; comparación frente a MSC-LLA).

### 3.2. Análisis comparado de la producción de diferentes citoquinas y quimioquinas por las MSCs de pacientes con LLA y donantes sanos.

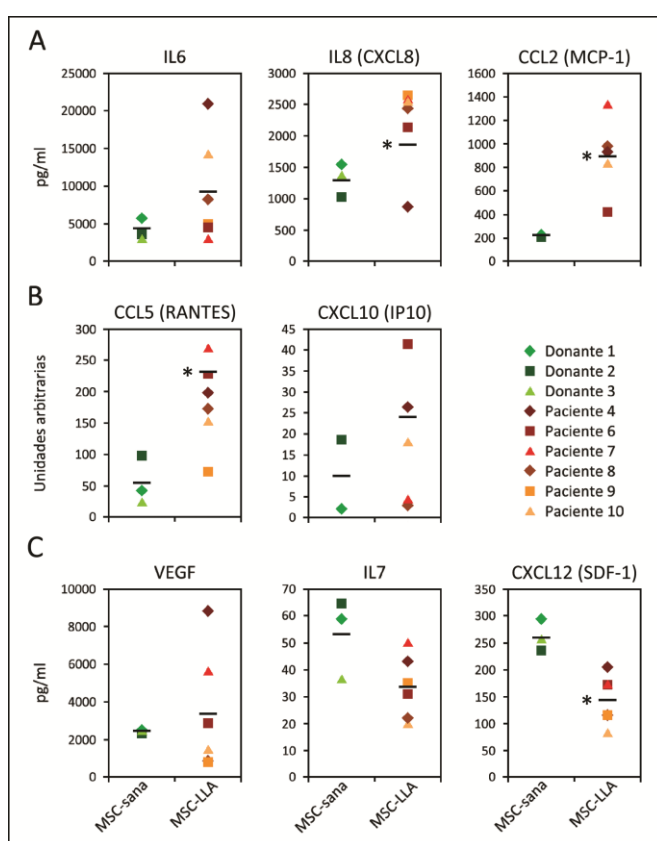
A continuación analizamos los niveles de producción, por parte de las MSCs, de diferentes citoquinas y quimioquinas que han sido relacionadas con la inflamación y el desarrollo tumoral<sup>102, 109, 304-306</sup>.

Una producción muy variable de la citoquina inflamatoria IL6 y de la quimioquina IL8 (CXCL8), fue encontrada tanto entre las muestras de MSCs de donantes sanos como entre las de MSCs derivadas de pacientes con LLA. Sin embargo, a pesar de esta variabilidad podía observarse la tendencia de las MSC-LLA a producir niveles mayores de ambos factores cuando se comparaban con las MSC-DS. La producción de la quimioquina CCL2 (MCP-1), fue también significativamente superior en los sobrenadantes de las MSC-LLA frente a las MSC-DS (Figura 20A). Los niveles de CCL5 (RANTES) y de CXCL10 (IP10) fueron muy bajos en todos los cultivos analizados lo que dificultaba el análisis de los posibles cambios entre las diferentes muestras. Sin embargo, el estudio a nivel de ARN mensajero reflejó para ambas



quimioquinas valores superiores, que llegaban a ser significativos en el caso de CCL5, en las MSCs de pacientes con LLA (Figura 20B). No se encontraron diferencias significativas en la producción de VEGF entre las MSCs de donantes sanos y de pacientes.

Analizamos además los niveles de IL7 y CXCL12 (SDF-1), dos factores producidos por las MSCs y que han sido demostrados ser claves en el mantenimiento del nicho y en la diferenciación de los linfocitos B<sup>39, 40</sup>. Como se muestra en la Figura 20C, tanto los niveles de IL7 como de CXCL12 estaban reducidos en los sobrenadantes obtenidos de cultivos de MSC-LLA respecto a los recogidos de las MSCs de donantes sanos. Esta reducción llegaba a ser significativa en el caso de la quimioquina CXCL12 (SDF-1).



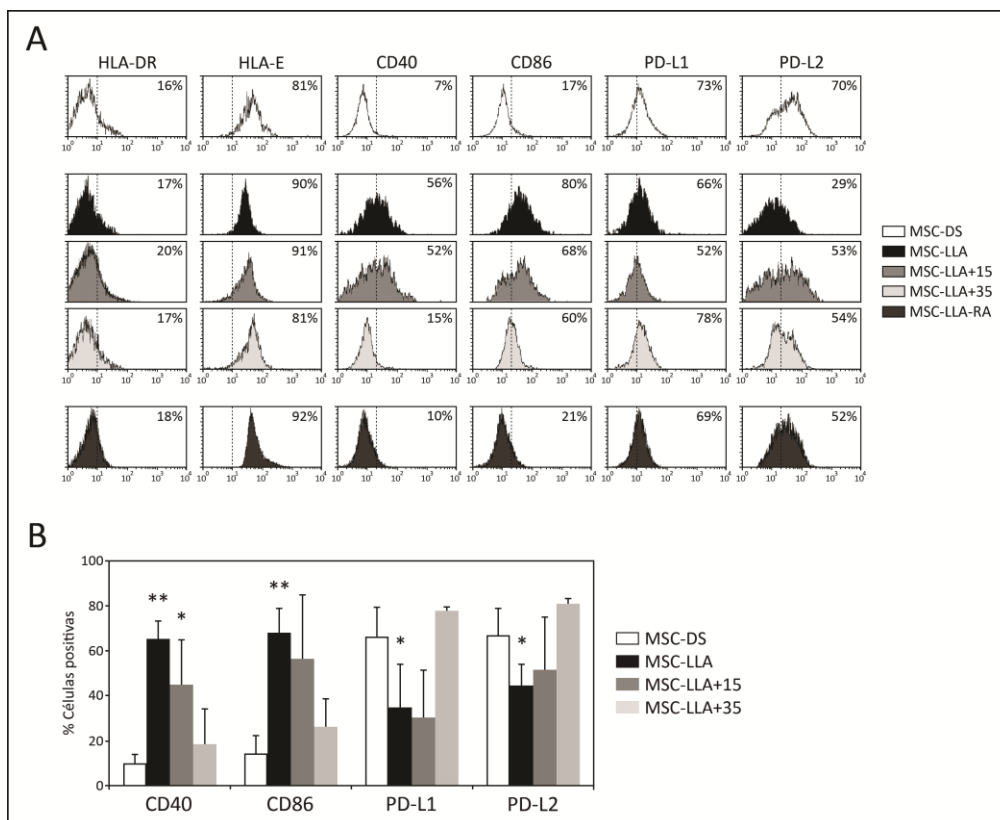
**Figura 20: Expresión y producción de citoquinas y quimioquinas en MSCs de donantes sanos y de pacientes de LLA.** MSC-DS y MSC-LLA fueron cultivadas en ausencia de estímulo durante seis días. (A) Tras el tiempo de cultivo indicado, se recogieron los sobrenadantes y se determinó la producción de IL6 y CCL2 (MCP-1) mediante CBA; y de IL8 (CXCL8) mediante ELISA. Las gráficas de dispersión representan las concentraciones determinadas en sobrenadantes de los cultivos correspondientes a tres muestras de MSC-DS y seis muestras de MSC-LLA. (B) Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de expresión de las quimioquinas CCL5 (RANTES) y CXCL10 (IP10), referidos a los niveles de GNB2L1. En las gráficas se recogen los datos de tres muestras MSC-DS y seis muestras MSC-LLA. (C) Determinación mediante ELISA Multiplex de los niveles de VEGF, IL7 y CXCL12 (SDF-1) en los sobrenadantes de los cultivos correspondientes a tres muestras de MSC-DS y seis muestras de MSC-LLA.

### **3.3. Las MSCs de los pacientes con LLA presentan una incrementada expresión de las moléculas CD40 y CD86, y reducen la de PD-L1 y PD-L2.**

Como hemos señalado en apartados anteriores, no sólo los factores solubles sino también señales mediadas a través de los contactos célula-célula pueden ser cruciales para definir el perfil inmunomodulador de las MSCs. En base a esto, a continuación analizamos por citometría de flujo la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD86 y la de los reguladores negativos de la función inmunitaria, PD-L1 y PD-L2. Como se recoge en diferentes trabajos, es precisamente la ausencia de expresión de las primeras y la fuerte expresión de los ligandos PD-Ls, en las MSCs de donantes sanos, lo que ha favorecido su empleo en terapia celular en el contexto de diferentes enfermedades autoinmunes y en la enfermedad injerto contra huésped<sup>83-86</sup>.

Como se muestra en la Figura 21A, a diferencia de lo descrito para las MSCs de donantes sanos, las MSCs de los pacientes diagnosticados de LLA exhibían una fuerte expresión de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD86 junto a una reducción en los niveles de expresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2. No se observaron cambios, sin embargo, en la expresión de moléculas del HLA-II, siendo prácticamente indetectable en todas las muestras de MSCs analizadas. En conjunto, este perfil contribuiría a las características inmunopotenciadoras de estas células en el contexto de la LLA de riesgo bajo/intermedio. Como sucedía con los factores solubles, los cambios fenotípicos exhibidos por las MSC-LLA fueron menores en las MSCs de pacientes tratados, asemejándose a las MSCs de donantes sanos (Figura 21B).

Por el contrario y en concordancia con su comportamiento inmunosupresor, la expresión de dichas moléculas en las MSCs aisladas de los pacientes con elevado riesgo de recaída fue similar al observado en MSCs de donantes sanos (Figura 21A).

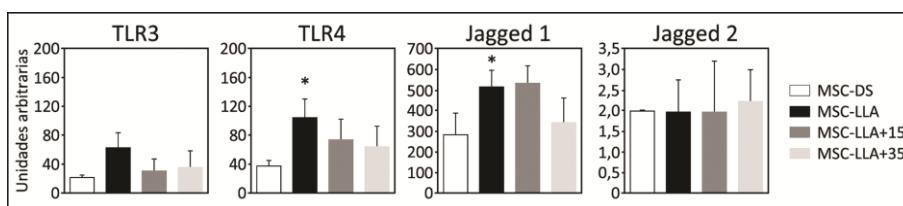


**Figura 21: Fenotipo de las MSCs de donantes sanos y de pacientes de LLA.** (A) MSCs fueron cultivadas durante seis días y tras este periodo se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo de la expresión de diferentes moléculas inmunomoduladoras. En los histogramas se indica el porcentaje de células positivas para cada marcador en MSCs de donantes sanos, MSCs de pacientes de LLA de bajo/intermedio riesgo en diferentes momentos de la enfermedad y MSCs de pacientes de LLA de alto riesgo. (B) Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de células positivas para las diferentes moléculas inmunomoduladoras analizadas. Los resultados representan la media de cinco experimentos independientes con un total cinco muestras de MSCs de donantes sanos y de pacientes de LLA. (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; comparación frente a MSC-DS).

### 3.4. La expresión del receptor tipo Toll TLR4 y del ligando Jagged1 se encuentra incrementada en las MSCs de los pacientes con LLA.

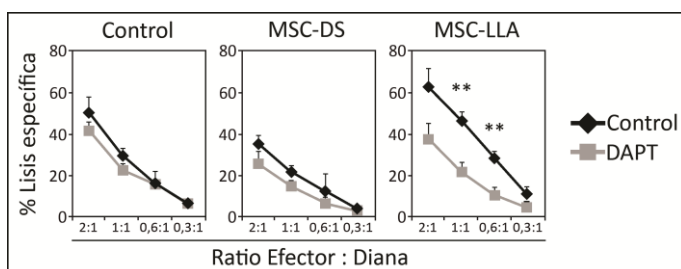
En los últimos años diferentes autores han apuntado la relevancia de los receptores tipo Toll en la biología de las MSCs y más concretamente, en la determinación de sus propiedades inmunomoduladoras<sup>81, 82</sup>. Estos trabajos sugieren una polarización de las MSCs hacia un fenotipo inmunoestimulador (MSC1) o inmunosupresor (MSC2) dependiendo de la activación de receptores tipo Toll, TLR4 y TLR3, respectivamente. Según lo descrito, la activación de TLR4 generaría MSCs inmunoestimuladoras con el concurso del

ligando de Notch, Jagged 1<sup>82</sup>. En nuestro estudio, si bien no se encontraron cambios significativos en los niveles de TLR3 entre las diferentes muestras de MSCs analizadas, pudimos observar un incremento significativo de la expresión de TLR4 en MSCs de pacientes de LLA frente a la expresión exhibida por las MSCs de donantes sanos. En paralelo se observó un incremento notable de la expresión de Jagged 1 en las muestras de pacientes (Figura 22).



**Figura 22: Estudio de la expresión de los receptores TLR3 y TLR4, y de los ligandos Notch Jagged 1 y Jagged 2 en diferentes MSCs.** MSC-DS y MSC-LLA aisladas en diferentes momentos de la enfermedad fueron cultivadas durante seis días en ausencia de estímulo. Posteriormente se analizaron los niveles de transcrito de los genes arriba indicados mediante PCRq. Los niveles de expresión de los diferentes genes se normalizaron frente al endógeno GNB2L1. Se muestra la media  $\pm$  desviación estándar de siete a diez muestras MSC-LLA y seis muestras MSC-DS. (\* $p \leq 0,05$ ; comparación frente a MSC-DS).

Dado que, por otro lado, la señalización Notch es importante en la proliferación y funcionalidad de las células NK<sup>307-309</sup>, el aumento de Jagged1 en las MSCs podía ser responsable, al menos en parte, de la activación de las células NK tras el cocultivo con las MSCs de pacientes con LLA. Para abordar este extremo, establecimos cultivos de las MSC-LLA con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa DAPT, previo al cultivo con las células NK. El bloqueo de la señalización Notch redujo de manera significativa la capacidad de las MSC-LLA para incrementar la funcionalidad de las células NK confirmando la implicación de esta vía en la función inmunopotenciadora de las MSCs de pacientes con LLA. En el caso de las MSC-DS, la administración del tratamiento no alteró su capacidad inmunosupresora, lo que sugería la participación de mecanismos diferentes en la función inmunomoduladora de las diferentes MSCs (Figura 23).



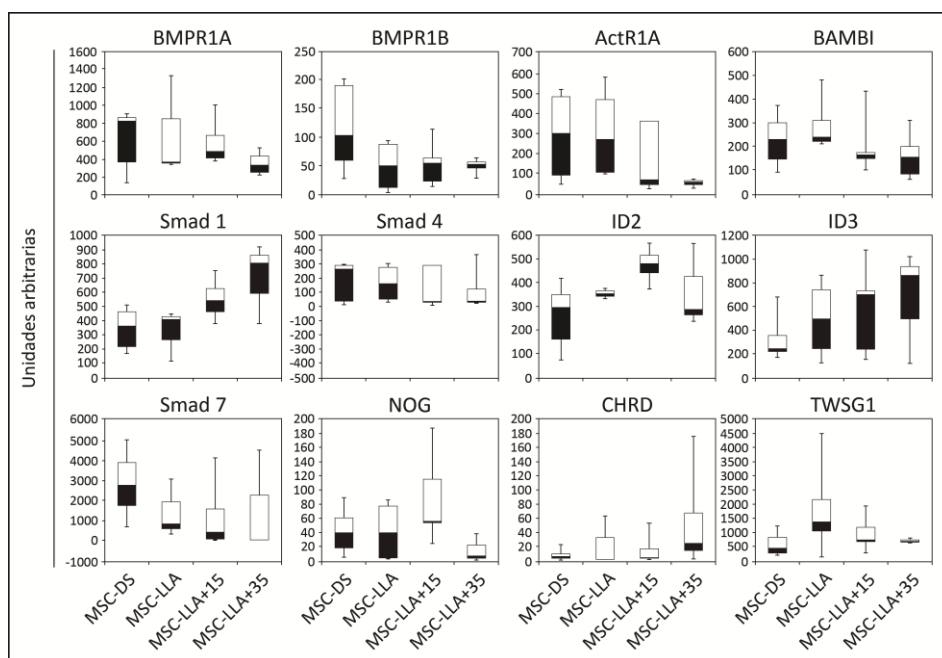
**Figura 23: Efecto del bloqueo de la señalización Notch1 en la función inmunomoduladora de MSC-LLA.** Células NK fueron cultivadas con MSC-DS o MSC-LLA, en presencia del inhibidor de la proteína  $\gamma$ -secretasa DAPT (50 $\mu$ M). Tras 36 horas de cultivo, las células NK se usaron como células efectoras en un ensayo de citotoxicidad de cuatro horas frente a la línea tumoral K562. La gráfica muestra el porcentaje de lisis específica a diferentes ratios célula efectora: célula diana. Se muestra un experimento representativo de un total de dos experimentos independientes con dos muestras MSC-DS y cuatro muestras MSC-LLA. (\*\* $p \leq 0,01$ ; comparación frente al tratamiento con DAPT).

En conjunto, los resultados presentados hasta el momento indican que al contrario de la función inmunosupresora descrita hasta ahora para las MSCs de donantes sanos, las MSCs aisladas de los pacientes con LLA en el momento del diagnóstico promueven la actividad antitumoral de las células NK en respuesta a la presencia de la leucemia. A este diferente comportamiento inmunomodulador de las MSC-LLA subyacen tanto cambios en la producción de factores solubles como modificaciones relevantes en el perfil de expresión de moléculas de membrana.

#### 4. CONTRIBUCIÓN DE BMP4 A LA FUNCIÓN INMUNOMODULADORA DE LAS MSCs.

##### 4.1. Las MSCs de donantes sanos y de pacientes con LLA expresan todos los componentes de la vía de señalización BMP2/4.

La vía de señalización BMP2/4, implicada en el desarrollo y homeostasis de diferentes tejidos y órganos, también se ha relacionado con el desarrollo y evolución de algunos tumores, aunque, como ya se ha discutido en el apartado *Introducción*, con cierta controversia en lo que respecta a su papel pro- o antitumoral. Los trabajos anteriores se han centrado fundamentalmente en el papel directo de la vía de señalización BMP2/4 en la proliferación y supervivencia de las células tumorales sin profundizar en el impacto que estos factores pueden tener sobre el microambiente tumoral o en la acción del sistema inmunitario sobre el tumor.



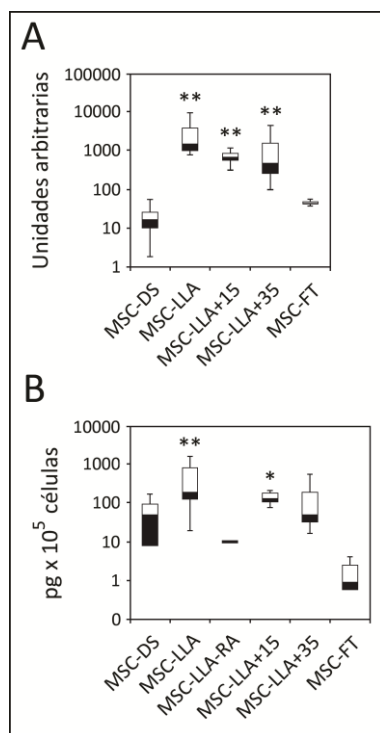
**Figura 24: Modulación de la expresión de los diferentes componentes de la vía de señalización BMP2/4 en las MSCs aisladas de pacientes con LLA a lo largo de la enfermedad.** Análisis por PCR cuantitativa de los genes arriba indicados, en MSCs de donantes sanos y MSCs de pacientes con LLA en el momento del diagnóstico y a los 15 y 35 días de iniciarse el tratamiento quimioterápico. Los niveles de expresión fueron normalizados a la expresión de GNB2L1. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de seis muestras de donantes sanos y once muestras de pacientes con LLA.

Teniendo en cuenta lo anterior, nuestro siguiente objetivo fue conocer la implicación de la vía de señalización BMP2/4 en aspectos concretos del desarrollo y progresión de la LLA. En primer lugar y, dada la importancia del microambiente medular en la biología de la enfermedad, analizamos los niveles de expresión de los componentes de la vía en las MSCs de donantes sanos y de pacientes con LLA aisladas en diferentes momentos de la enfermedad. El análisis por PCR cuantitativa indicó que tanto las células de los pacientes como de los donantes sanos presentaban transcritos específicos para los receptores tipo I (BMPRIA, BMPRIB y ActRIA), la proteína BR-Smad (Smad1) y la proteína Co-Smad (Smad4), además de los genes diana (ID2 e ID3). También expresaban distintas moléculas implicadas en la regulación de la vía a diferentes niveles, como los antagonistas solubles Noggin, Chordin y Twisted Gastrulation, el pseudorreceptor Bambi y la proteína I-Smad, Smad7 (Figura 24). Sin embargo, no se encontraron diferencias reseñables en la expresión de ninguno de los componentes mencionados entre las diferentes MSCs.

#### **4.2. Producción incrementada de BMP4 por las MSCs aisladas de pacientes con LLA.**

A continuación se analizaron los niveles de expresión de los diferentes ligandos de la vía, observándose diferencias significativas en la expresión del ligando BMP4 entre las MSCs de los pacientes en el momento del diagnóstico y las de los donantes sanos (Figura 25). Como muestra la Figura 25A a medida que se avanzaba en el tratamiento de la enfermedad estos niveles iban reduciéndose hasta alcanzar valores similares a los exhibidos por las MSCs de donantes sanos.

Para corroborar este resultado se analizó la producción del ligando en el sobrenadante tras seis días de cultivo de las diferentes MSCs. Como se observa en la Figura 25B, los cambios en la producción del morfógeno correlacionan con los cambios antes observados en la expresión del transcrito. Las MSCs de los pacientes aisladas en el momento del diagnóstico presentaban niveles elevados de la proteína, que posteriormente iban disminuyendo a lo largo del tratamiento. Además, puesto que ya se habían observado diferencias entre las MSCs de pacientes catalogados de riesgo bajo/intermedio de recaída respecto a las de pacientes con riesgo alto, decidimos analizar por separado los niveles de expresión del morfógeno entre ambas, encontrando que en las últimas, los niveles de expresión eran menores y muy similares a los de las MSCs de donantes sanos.

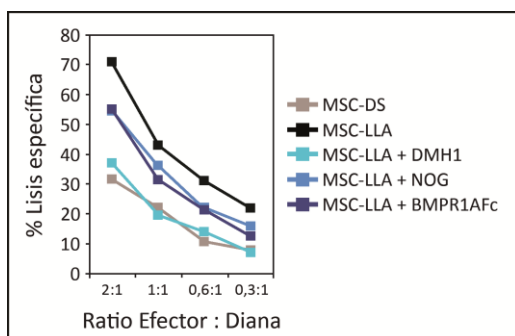


**Figura 25: Cambios en los niveles de producción y expresión del ligando BMP4 en MSCs de pacientes con LLA, a lo largo de la enfermedad.** (A) MSC-DS y MSC-LLA aisladas en diferentes momentos de la enfermedad fueron cultivadas durante seis días y posteriormente analizados los niveles de ARN mensajero del ligando mediante PCR cuantitativa. Los valores fueron normalizados a la expresión del endógeno GNB2L1. La gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de seis donantes sanos, once pacientes con LLA y tres pacientes ya recuperados y fuera de tratamiento. (B) Análisis de los niveles de producción de BMP4 mediante ELISA. Las barras muestran la media  $\pm$  desviación estándar de las muestras anteriormente indicadas, incluyendo dos muestras de pacientes con riesgo alto de recaída. (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; comparación frente a MSC-DS).

#### 4.3. La señalización BMP2/4 como mediador en la función inmunomoduladora de las MSCs.

Puesto que las MSCs de los pacientes producían mayores cantidades del ligando BMP4 y nuestro grupo había descrito previamente un importante papel de este factor en la funcionalidad de las células NK <sup>256</sup>, a continuación analizamos la implicación de BMP4 en la adquisición de las propiedades inmunoestimuladoras de las MSC-LLA. Para ello cultivos de MSC-LLA fueron tratados con el inhibidor de la vía canónica de BMP DMH1, durante 12 horas previo a su cultivo con las células NK. Posteriormente y tras 36 horas de cocultivo, las células NK que habían estado en presencia de las MSC-LLA pretratadas con DMH1, mostraron la misma capacidad citotóxica que aquellas cultivadas con las MSC-DS. La adición, a los cultivos de las MSC-LLA, de otros antagonistas de la vía de señalización BMP4, como el receptor soluble BMPRIA, que bloquea la unión del ligando al receptor, y Noggin, antagonista fisiológico soluble, redujeron también la capacidad citotóxica de las células NK aunque en menor medida (Figura 26).

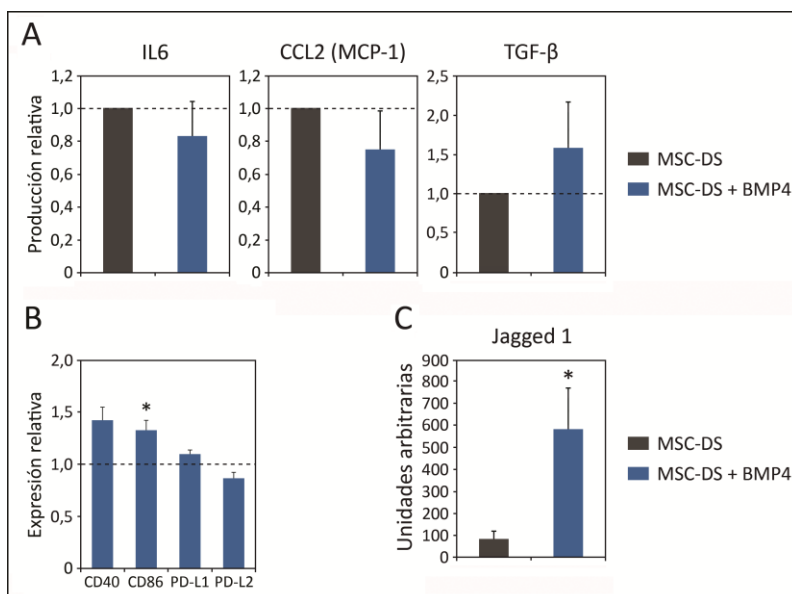




**Figura 26: Efecto de diferentes inhibidores de la vía señalización BMP2/4 sobre la función inmunomoduladora de las MSCs.** Células NK fueron cultivadas durante 36 horas con igual número de MSCs de donantes sanos o de pacientes con LLA pretratadas con diferentes inhibidores de la vía de señalización BMP2/4. Tras el periodo de tiempo indicado, las células NK se aislaron y su capacidad lítica fue evaluada en un ensayo de citotoxicidad contra la línea tumoral K562, a diferentes ratios célula efectora: célula blanco. La gráfica muestra los datos de un experimento representativo de un total de dos experimentos independientes en los que se usaron dos muestras de donantes sanos y dos muestras de pacientes con LLA.

Si como apuntan los resultados anteriores, BMP4 es uno de factores por el cual las MSCs del estroma medular adquieren un fenotipo inmunoestimulador, la adición de la molécula a cultivos de MSC-DS podría revertir el efecto inmunosupresor que estas células ejercen sobre las células NK. Para analizar esta posibilidad, se administró BMP4 exógeno durante 6 días a cultivos de MSCs de donantes sanos, analizándose tras este periodo los efectos en la producción de diferentes factores solubles y expresión de moléculas de membrana. Como queda recogido en la Figura 27A, la adición de BMP4 a los cultivos no modificó la producción de los factores solubles IL6, CCL2 (MCP-1) o TGF- $\beta$  por las MSC-DS. Por el contrario, sí se observó un ligero incremento de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD86, que en el caso de esta última fue significativo, así como del ligando Jagged 1 tras el tratamiento con el morfógeno (Figuras 27B y 27C).

En conjunto estos resultados sugieren que una producción incrementada de BMP4 podría contribuir a los cambios observados en el comportamiento inmunomodulador de las MSC-LLA, si bien no sería el único responsable de los mismos.



**Figura 27: Efecto de la adición de BMP4 sobre la capacidad inmunomoduladora de las MSCs.** MSCs aisladas de donantes sanos fueron cultivadas durante 6 días en medio suplementado con BMP4 (100ng/ml). (A) Determinación mediante CBA de la concentración de IL6, CCL2 (MCP-1) y TGF-β en el sobrenadante de los cultivos. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de los niveles de producción de tres muestras de donantes sanos, referida a la producida por dichas muestras en condiciones control. (B) Análisis por citometría de flujo de la expresión de diferentes moléculas coestimuladoras. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar de la expresión de dichas moléculas tras tratamiento de las MSC con BMP4 (valor control, 1; n=3 muestras de MSC-DS). (C) Estudio de los niveles de ARN mensajero del ligando Jagged 1 mediante PCR cuantitativa, normalizados frente al endógeno GNB2L1. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de los niveles de expresión de cuatro muestras de donantes sanos. (\* $p \leq 0,05$ ; comparación frente a MSC-DS).

## **5. PAPEL DE BMP4 EN LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS Y RELEVANCIA EN EL CONTROL DE LA EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO.**

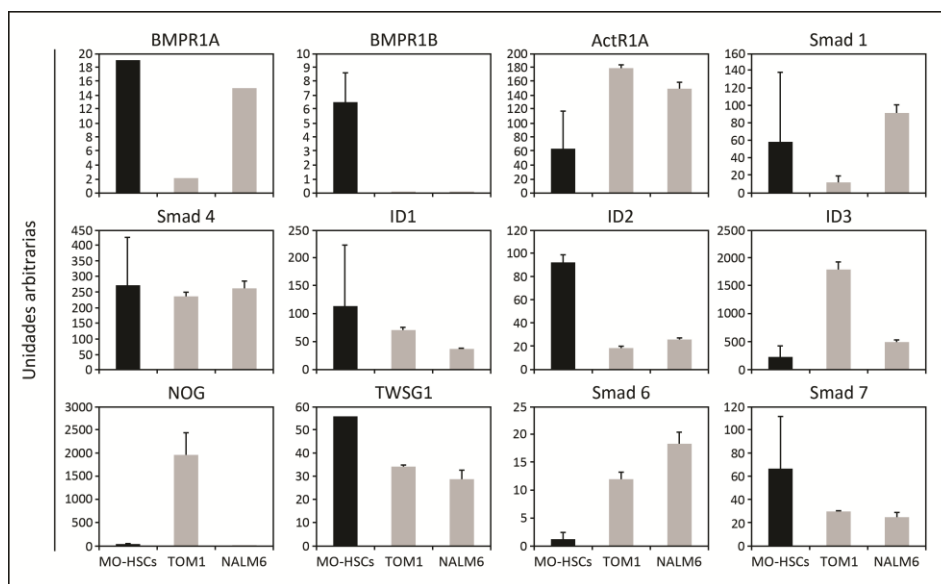
Analizamos a continuación el efecto que podrían tener las elevadas concentraciones de BMP4 producidas por el nicho medular en la biología de las células leucémicas y cómo podría estar afectando a la acción del sistema inmunitario frente a la enfermedad.

### **5.1. Las líneas leucémicas TOM1 y NALM6 expresan los componentes de la vía de señalización BMP2/4.**

Debido a la dificultad para trabajar con cultivos de células primarias, decidimos abordar en un primer momento el estudio empleando líneas leucémicas. En nuestro modelo experimental empleamos dos líneas leucémicas ya establecidas de leucemia linfoblástica aguda tipo B, con diferente riesgo de recaída, cuyo origen y características se recogen en la Tabla 4 del apartado *Material y Métodos*.

Como primera aproximación y con el fin de determinar si las células leucémicas serían capaces de responder a los elevados niveles del ligando presentes en el nicho medular, analizamos la expresión de los diferentes componentes de la vía de señalización BMP2/4 por PCR cuantitativa.

Como se muestra en la Figura 28, tanto la línea leucémica NALM6 como la línea TOM1 presentaban transcritos para el receptor tipo I ActRIA, mientras que el receptor BMPRIA, solo se detectó en la primera y el receptor BMPRIB fue prácticamente indetectable en ambas líneas. En el caso de la línea leucémica NALM6, se encontraron mayores niveles de expresión de la proteína responsable de la transducción de la señal BR-Smad, Smad-1, mientras que la proteína Co-Smad, Smad-4, se expresaba de manera similar en ambas líneas. Respecto a la expresión de los genes diana, esta fue muy similar entre ambas líneas, excepto en el caso de ID3 cuyos niveles de expresión eran mucho mayores en la línea TOM1. El estudio se completó con el análisis de las diferentes moléculas que regulan negativamente la vía, entre las que destaca Noggin, cuya expresión fue muy elevada en la línea leucémica TOM1 pero indetectable en NALM6.



**Figura 28: Expresión de los componentes de la vía de señalización de BMP2/4 en líneas leucémicas.** Análisis mediante PCR cuantitativa de los niveles de ARN mensajero para los distintos receptores, BR-Smads y Co-Smads, proteínas ID y antagonistas de la vía BMP2/4 en las líneas leucémicas TOM1 y NALM6 tras 3 días de cultivo. Como controles sanos se usaron muestras de células stem hematopoyéticas aisladas de la médula ósea de donantes. Los niveles de expresión de los diferentes componentes fueron normalizados a la expresión del endógeno GNB2L1. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

En conjunto, estos datos indican que tanto la línea leucémica de riesgo bajo NALM6, como la de riesgo alto TOM1, podrían responder a los elevados niveles de BMP4 del microambiente medular, puesto que disponen de toda la maquinaria molecular necesaria para ello. Sin embargo, los niveles de expresión tan elevados del antagonista Noggin sugerían una posible inhibición de la vía en el caso de TOM1.

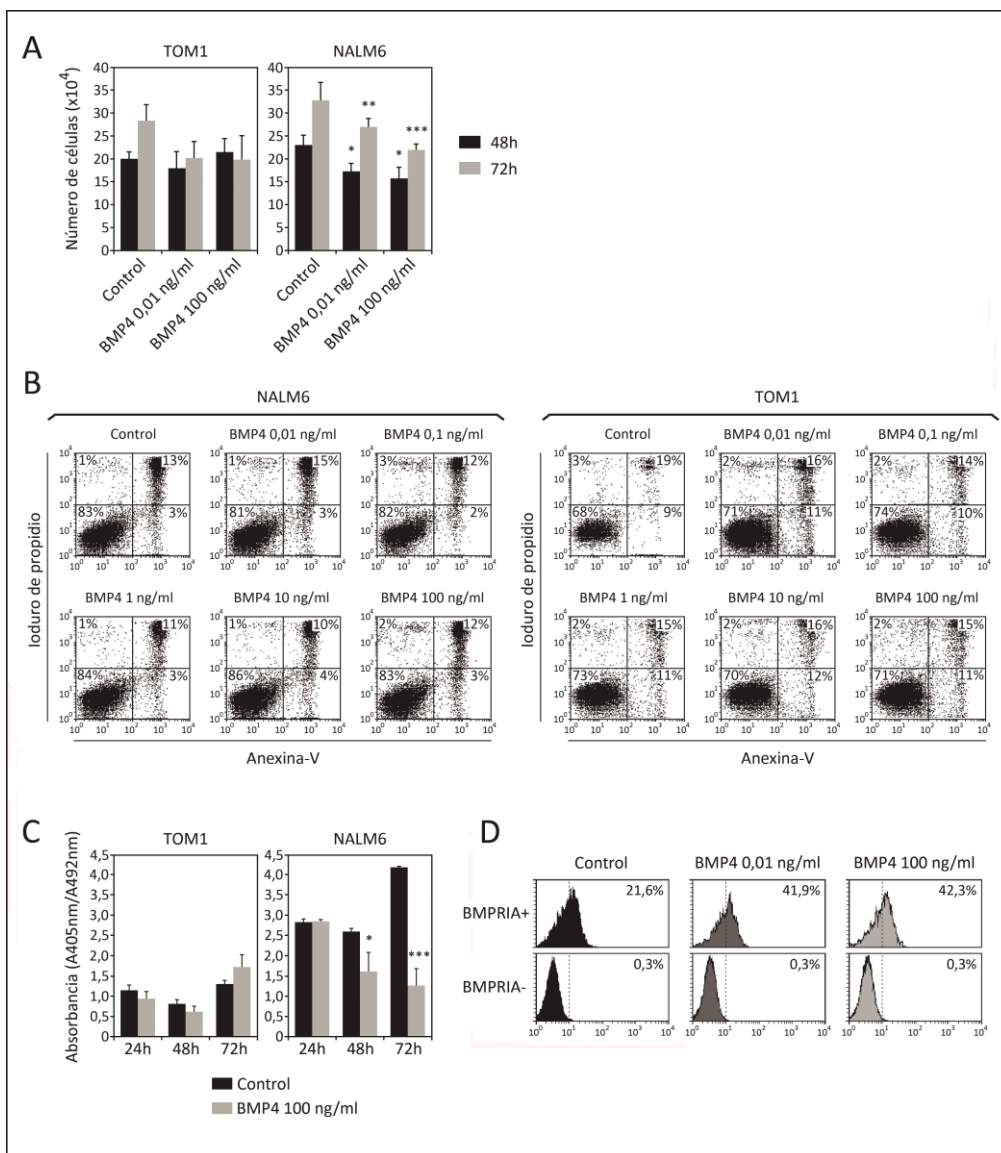
## 5.2. Niveles incrementados de BMP4 provocan una disminución de la proliferación de las células de la línea leucémica de bajo riesgo, NALM6.

La adición de diferentes concentraciones de BMP4 a los cultivos de células leucémicas redujo de manera significativa el número de células recuperadas en el caso de NALM6; cambio que se hizo mucho más evidente a las 72 horas de cultivo. Por el contrario, la presencia del ligando no modificó de manera significativa la recuperación celular en el caso de los cultivos de la línea TOM1 (Figura 29A).

A continuación, analizamos el efecto de BMP4 sobre la proliferación y/o la supervivencia de las células leucémicas como posibles mecanismos responsables de la reducción en la recuperación celular en los cultivos anteriores. Tras tres días de cultivo, la adición de dosis crecientes del ligando no afectó a la viabilidad de ninguna de las dos líneas, como se observa en la Figura 29B. Por el contrario, la adición de BMP4 redujo significativamente la proliferación de las células leucémicas de la línea NALM6 a las 72 horas de iniciarse el tratamiento y tras la administración de dosis altas del morfógeno, lo que correlacionaba con la reducción en el número de células recuperadas descrito anteriormente. En línea con los resultados anteriores, no se observó ningún efecto sobre la capacidad proliferativa de la línea leucémica TOM1 (Figura 29C).

Para profundizar en el mecanismo por el que BMP4 ejercía sus efectos antiproliferativos sobre las células de la línea leucémica NALM6, analizamos la expresión de la proteína p27 por haber sido descrita en otros sistemas como mediador de los efectos de BMP4 sobre el ciclo celular <sup>310</sup>. Como se muestra en la Figura 29D, la expresión de p27 estaba principalmente asociada a células capaces de responder al morfógeno, apareciendo dicha expresión significativamente incrementada tras la adición de BMP4 a los cultivos.

Estos datos sugieren que BMP4 producido por las MSC del estroma medular de los pacientes con LLA actuaría de forma paracrina sobre las células leucémicas, afectando a su proliferación pero no así a su supervivencia. El hecho de no detectar ningún efecto sobre la línea leucémica TOM1 podría deberse a la presencia del antagonista Noggin, que la haría refractaria a los efectos de BMP4 exógeno.



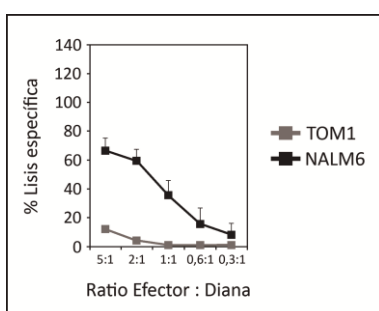
**Figura 29: Efecto de la adición de BMP4 en la biología de las células leucémicas.** Cultivo de las líneas leucémicas NALM6 y TOM1 durante diferentes tiempos en medio suplementado con BMP4 (0,01ng/ml-100ng/ml) (A) Número de células recuperadas tras 48 y 72 horas de tratamiento con BMP4. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. (B) Análisis por citometría de flujo de la viabilidad de las células leucémicas tras 72 horas de tratamiento, mediante tinción con Anexina V e iodo de propidio. En los dot-plots se muestra el porcentaje de células de cada subpoblación, siendo consideradas como viables aquellas células Anexina<sup>-</sup> IP<sup>-</sup>. Se muestra un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes. (C) Análisis de la tasa proliferativa de las células tras tratamiento, en términos de incorporación de BrdU. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. (D) Estudio por citometría de flujo de los niveles de expresión de p27 en la línea leucémica NALM6. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para p27 en las dos subpoblaciones definidas en base a la expresión del receptor BMPRIA. Los datos corresponden a un experimento representativo de un total de cinco experimentos independientes. (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; comparación frente a células leucémicas cultivadas en condiciones control).

### 5.3. BMP4 incrementa la susceptibilidad de las células leucémicas a la lisis mediada por las células NK.

La modulación de los ligandos para los receptores de activación o de inhibición de las células NK podría contribuir a una mayor efectividad de estas células frente al tumor, o bien ayudaría a la evasión de las células tumorales a la acción del sistema inmunitario, como se ha descrito recientemente en la literatura para diferentes tipos de tumor <sup>159-166, 168, 169, 311</sup>.

Una de las estrategias utilizadas por las células tumorales para evadir concretamente la acción de las células NK, sería la regulación negativa o liberación al medio de los ligandos para los receptores de activación NKP46/44/30 y NKG2D responsables de la funcionalidad de las células NK y/o la regulación positiva de los ligandos inhibidores, como MHC-I clásicas y no clásicas.

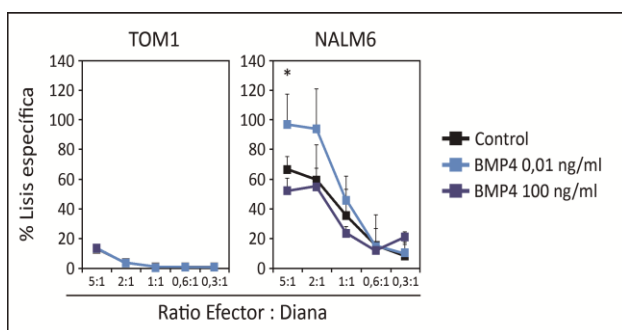
Para poder evaluar el posible efecto de BMP4 en la susceptibilidad de las células leucémicas a la lisis por células NK, en primer lugar estudiamos la capacidad de estas últimas para lisar, en condiciones basales, células de las líneas NALM6 y TOM1. Como se observa en la Figura 30, mientras que la línea NALM6 era altamente sensible a la lisis mediada por células NK, las células de la línea TOM1 presentaban una viabilidad superior al 80% al finalizar el ensayo de citotoxicidad, comportándose como una línea resistente a la lisis mediada por células NK. Una expresión diferencial de ligandos activadores e inhibidores en las dos líneas podría justificar este diferente comportamiento.



**Figura 30: Susceptibilidad de las células leucémicas a la lisis mediada por las células NK.** Células NK fueron estimuladas durante 12 horas con las citoquinas IL12 (10ng/ml) e IL15 (100ng/ml) y posteriormente enfrentadas en un ensayo de citotoxicidad a las líneas leucémicas NALM6 y TOM1, a diferentes ratios célula efectora: célula blanco. La gráfica muestra el porcentaje medio de lisis específica  $\pm$  desviación estándar de dos a cuatro experimentos independientes.

A continuación llevamos a cabo un ensayo de citotoxicidad similar al anterior pero en el que las células de las líneas NALM6 y TOM1 habían sido pretratadas con diferentes dosis de BMP4 durante 3 días. Si bien el pretratamiento de la línea TOM1 con el morfógeno no

alteró su resistencia a la acción de las células NK (Figura 31), los niveles de la enzima LDH medidos en el sobrenadante de los cultivos de NALM6 indicaban una mayor sensibilidad de estas células a la actividad lítica de las células NK tras la administración de BMP4.



**Figura 31: Efecto de la adición de BMP4 sobre la susceptibilidad de las células leucémicas a la lisis mediada por las células NK.** Células leucémicas fueron cultivadas con diferentes dosis de BMP4 (0,01ng/ml; 100ng/ml) durante tres días y posteriormente enfrentadas a células NK, previamente estimuladas con IL12 (10ng/ml) e IL15 (100ng/ml), en un ensayo de citotoxicidad. La gráfica muestra el porcentaje medio de lisis específica  $\pm$  desviación estándar de dos a cuatro experimentos independientes (\* $p \leq 0,05$ ; comparación frente a células leucémicas cultivadas en condiciones control).

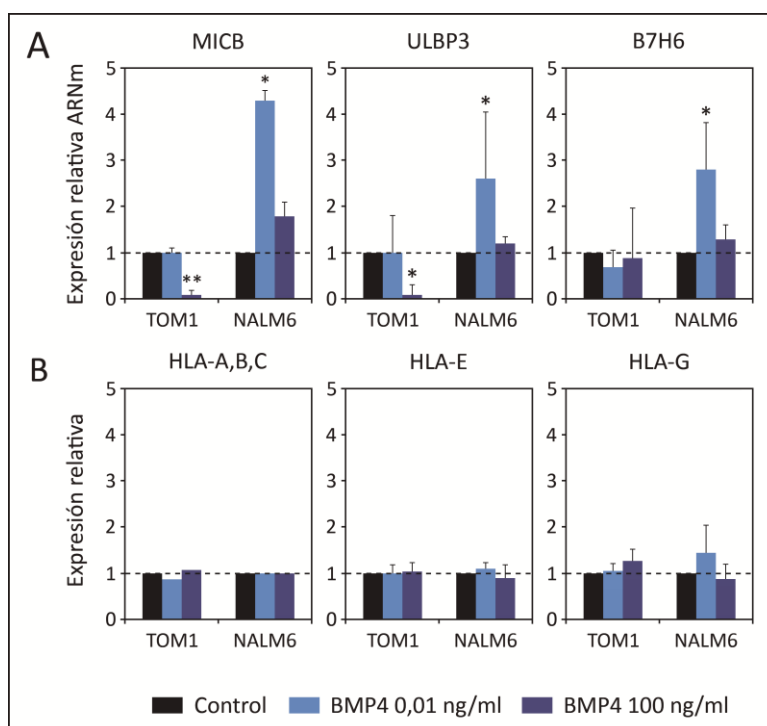
Para conocer los posibles mecanismos que subyacen a este incremento de la sensibilidad a la lisis inducido por BMP4, analizamos por PCR cuantitativa la expresión de diferentes ligandos activadores e inhibidores así como de la serpina PI9, en células leucémicas tras el tratamiento con BMP4.

El análisis de los niveles de ARN mensajero de los ligandos para receptores de activación, tras administración de BMP4, mostró un importante incremento de éstos, en comparación con los niveles de expresión basales, en la línea NALM6. Interesantemente el efecto mayor de BMP4 se consiguió, en correlación con el ensayo funcional de citotoxicidad, con las dosis más bajas del morfógeno. Por el contrario, en la línea TOM1 dichos niveles se vieron reducidos, particularmente en el caso de los ligandos para NKG2D (Figura 32A).

Respecto a las moléculas MHC-I tanto clásicas como no clásicas, los niveles de expresión medidos mediante citometría de flujo apenas se vieron modificados por la presencia de BMP4, ni en la línea NALM6 ni en TOM1 (Figura 32B).

La expresión de PI9 en NALM6 siguió siendo prácticamente indetectable tras la adición de BMP4 (CTL:  $0,7 \pm 1,1$ ; BMP4 0,01:  $0,4 \pm 0,4$ ; BMP4 100:  $0,1 \pm 0,1$ ).





**Figura 32: Efecto de la adición de BMP4 sobre la expresión en células leucémicas de ligandos inhibidores y activadores para células NK.** Células leucémicas fueron tratadas durante 3 días con diferentes dosis de BMP4 (0,01ng/ml; 100ng/ml). (A) Análisis por PCR cuantitativa de los niveles de expresión de los ligandos activadores arriba indicados (valor control, 1). Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; comparación frente a células leucémicas cultivadas en condiciones control). (B) Análisis por citometría de flujo de los ligandos inhibidores arriba indicados (valor control, 1). Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar de dos a cinco experimentos independientes.

Por tanto, la exposición de las células de la línea leucémica de bajo riesgo NALM6 a elevadas concentraciones de BMP4, como los que se observan en el nicho tumoral de pacientes de LLA de bajo riesgo, incrementaría los niveles de expresión de ligandos para receptores de activación de las células NK, lo que implicaría una mayor sensibilidad a la acción de éstas y, en consecuencia, a la acción del sistema inmunitario frente a la enfermedad.

## 6. EXPRESIÓN DE LIGANDOS PARA LOS RECEPTORES DE LAS CÉLULAS NK EN MUESTRAS PRIMARIAS DE LLA. RELEVANCIA DE LA EXPRESIÓN DE B7H6 EN EL CONTEXTO DE LA RECAÍDA LEUCÉMICA.

### 6.1. Análisis de la expresión de ligandos para los receptores de las células NK en muestras primarias de LLA.

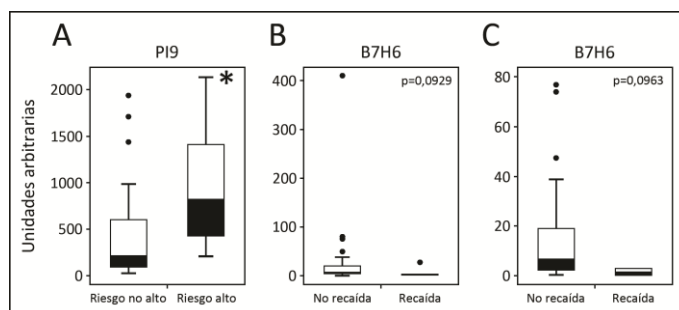
Puesto que habíamos observado diferencias en la expresión de ligandos y, en consecuencia, de la susceptibilidad de las células leucémicas a la lisis mediada por las células NK, en función del riesgo de recaída e influido por la presencia de BMP4 en el medio, extendimos nuestro estudio a muestras primarias de LLA, con el fin de conocer si el comportamiento era similar al observado en las líneas celulares.

Se analizó, en 57 muestras primarias de pacientes de LLA, la expresión de los ligandos para las células NK seleccionando para el estudio aquellos que mostraban mayores niveles en las líneas leucémicas. Así mismo se analizó la expresión de la serpina PI9 que, a diferencia de las líneas analizadas, presentaba una expresión elevada en las muestras primarias de pacientes de LLA.

En primer lugar se compararon los niveles de expresión de los diferentes transcritos entre aquellos pacientes diagnosticados de riesgo alto de recaída frente a aquellos con riesgo bajo/intermedio. Los datos mostraron un incremento significativo de la serpina PI9 en los pacientes con elevado riesgo de recaída, como puede observarse en la Figura 33A. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los ligandos de los receptores de las células NK entre los dos grupos de pacientes (Riesgo alto vs Riesgo no alto: MICB  $173,78 \pm 34,11$  vs  $179,75 \pm 58,99$ ; ULBP3  $29,93 \pm 11,44$  vs  $15,30 \pm 6,95$ ; B7H6  $14,27 \pm 3,31$  vs  $48,16 \pm 40,06$ ).

Por otro lado, se compararon los niveles de expresión de dichos ligandos entre los pacientes con LLA que no recaían frente a los que sí lo hacían independientemente del diagnóstico inicial. No se observó una correlación entre recaída y menor expresión de MICB o ULBP3. Por el contrario, una expresión reducida del ligando B7H6 era evidente en las muestras de LLA de pacientes que recaían frente a aquellos que no lo hacían (Figura 33B) siendo incluso esta diferencia significativa cuando eran considerados únicamente los

pacientes diagnosticados de LLA-B con riesgo intermedio/bajo que recayeron en la enfermedad frente a los que no recayeron (Figura 33C).

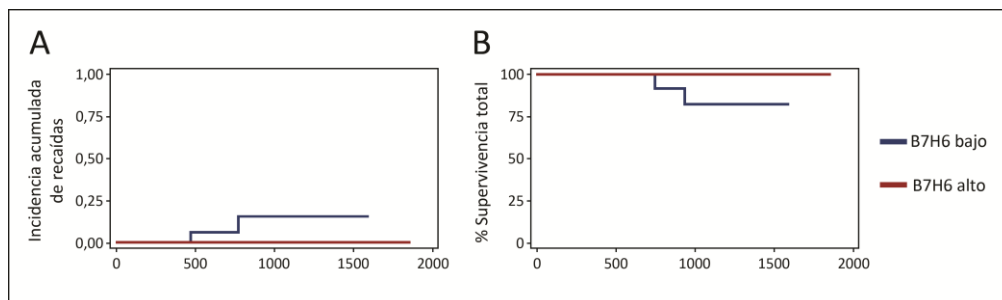


**Figura 33: Niveles de expresión de la serpin PI9 y del ligando para el receptor NKp30, B7H6, en muestras de pacientes diagnosticados de LLA.** Análisis mediante PCR cuantitativa de las moléculas indicadas en 57 pacientes con LLA. (A) Expresión de la serpin PI9 en pacientes con LLA, según el riesgo de recaída en la enfermedad (\* $p \leq 0,05$ ; comparación frente a pacientes con riesgo bajo/intermedio de recaída). (B) Expresión del ligando B7H6 en pacientes con LLA que recayeron frente a los que no lo hicieron. (C) Expresión del ligando B7H6 en pacientes con LLA de riesgo bajo o intermedio de recaída, que recayeron frente a los que no lo hicieron.

## 6.2. La expresión del ligando B7H6 se encuentra reducida en pacientes con LLA-B catalogados de riesgo bajo/intermedio que recaen en la enfermedad.

Los resultados obtenidos en el apartado anterior sugieren que B7H6 podría ser un factor diagnóstico indicativo de protección frente a recaídas. Para confirmar este resultado realizamos un análisis de los niveles de expresión de B7H6 dentro del grupo de pacientes de riesgo intermedio o bajo, en función de la mediana (6,14). Se establecieron así dos grupos, uno con niveles de B7H6 mayores de la mediana y otro con valores inferiores, y se estudió la incidencia de recaídas así como la supervivencia entre ambos. Interesantemente, se observaba que el grupo de pacientes con un valor de expresión del ligando menor al valor de la mediana presentan una mayor tendencia a sufrir recaídas ( $p=0,0033$ ) (Figura 34A) así como una menor supervivencia global ( $81,82\% \pm 11,63\%$ ) frente al grupo de pacientes cuyo valor de B7H6 es superior a la misma ( $100\% \pm 0\%$ ) (Figura 34B).

Si bien un mayor número de muestras sería necesaria para confirmar estos resultados, los obtenidos con esta cohorte inicial de pacientes sugieren que los niveles de expresión de B7H6 permitiría identificar un grupo de pacientes con mayor riesgo de recaída, dentro incluso del grupo diagnóstico de riesgo bajo/intermedio, que necesitarían recibir un tratamiento quimioterápico más agresivo.



**Figura 34: La expresión del ligando activador de las células NK, B7H6, define un grupo de pacientes con LLA con menor incidencia de recaídas.** Estudio de la incidencia acumulada de recaídas (A) y del porcentaje de supervivencia (B) de pacientes con LLA en función de los niveles de expresión del ligando B7H6. Cálculo de las curvas según el modelo Kaplan-Meier y comparación entre ellas según el modelo Cox. Diferencias entre grupos con  $p \leq 0.05$  fueron consideradas estadísticamente significativas.

## **7. CAMBIOS FENOTÍPICOS Y FUNCIONALES DE LAS CÉLULAS NK TRAS INTERACCIÓN CON LAS CÉLULAS LEUCÉMICAS.**

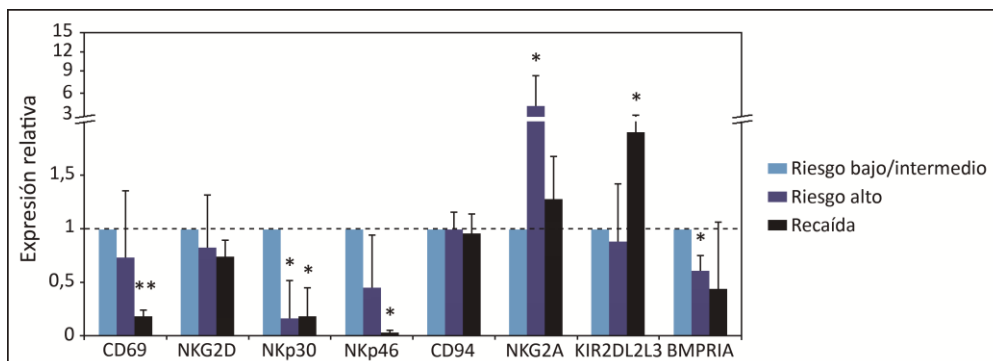
Diferentes trabajos en la literatura describen, en distintas neoplasias, una pérdida parcial de la funcionalidad de las células NK que las convierte en células poco eficaces para hacer frente al tumor. Nuestro siguiente objetivo fue analizar el perfil de receptores activadores e inhibidores de las células NK presentes en la médula ósea de pacientes de LLA en el momento del diagnóstico, así como las consecuencias de la interacción entre las células leucémicas y las células NK.

### **7.1. Perfil fenotípico de las células NK presentes en la médula ósea de los pacientes con LLA.**

En el estudio realizado mediante citometría de flujo, se comparó el fenotipo de las células NK de los pacientes con riesgo bajo/intermedio de recaída, frente a aquellos con riesgo alto o que habían recaído en la enfermedad.

Así, encontramos que los niveles de expresión de CD69 y de los receptores de activación NKp30 y NKp46 se encontraban disminuidos en células NK de pacientes con elevado riesgo de recaída, frente a los niveles exhibidos para estos mismos marcadores en células NK de pacientes de riesgo bajo. Esta reducción era aún más drástica cuando se analizaban las células NK de pacientes en el momento de la recaída. Por el contrario, la expresión de los receptores de inhibición KIR2DL2L3 y NKG2A se incrementó en estos mismos pacientes (Figura 35). Dado que resultados previos del grupo indicaban que la activación de la vía de señalización de BMP4 es un evento temprano necesario para la activación de las células NK, analizamos en estas mismas muestras la expresión del receptor BMPRIA. Como se observa en la Figura 35, las células NK de pacientes de LLA de alto riesgo o que recayeron presentaban una expresión del receptor para BMP4 reducida respecto a aquellas células NK de pacientes catalogados de riesgo bajo/intermedio.

Estos datos sugerirían que en aquellos pacientes catalogados de alto riesgo o aquellos que habían sufrido recaídas, independientemente del grupo de riesgo, el grado de activación de las células NK sería menor y, en consecuencia, su eficacia para hacer frente al tumor estaría limitada.



**Figura 35: Estudio del perfil fenotípico de células NK de la médula ósea de pacientes con LLA.** Análisis por citometría de flujo de diferentes moléculas relacionadas con la funcionalidad de las células NK, en aspirados de médula ósea de pacientes diagnosticados de LLA de riesgo bajo o intermedio ( $n=7$ ), pacientes con riesgo alto de recaída ( $n=5$ ) y pacientes que recayeron ( $n=5$ ). La gráfica muestra la media  $\pm$  desviación estándar de los niveles de expresión de los diferentes marcadores referidos a los niveles de expresión en las células NK de médula ósea de los pacientes con riesgo bajo o intermedio de recaída (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; comparación frente a células NK de pacientes con riesgo bajo/intermedio de recaída).

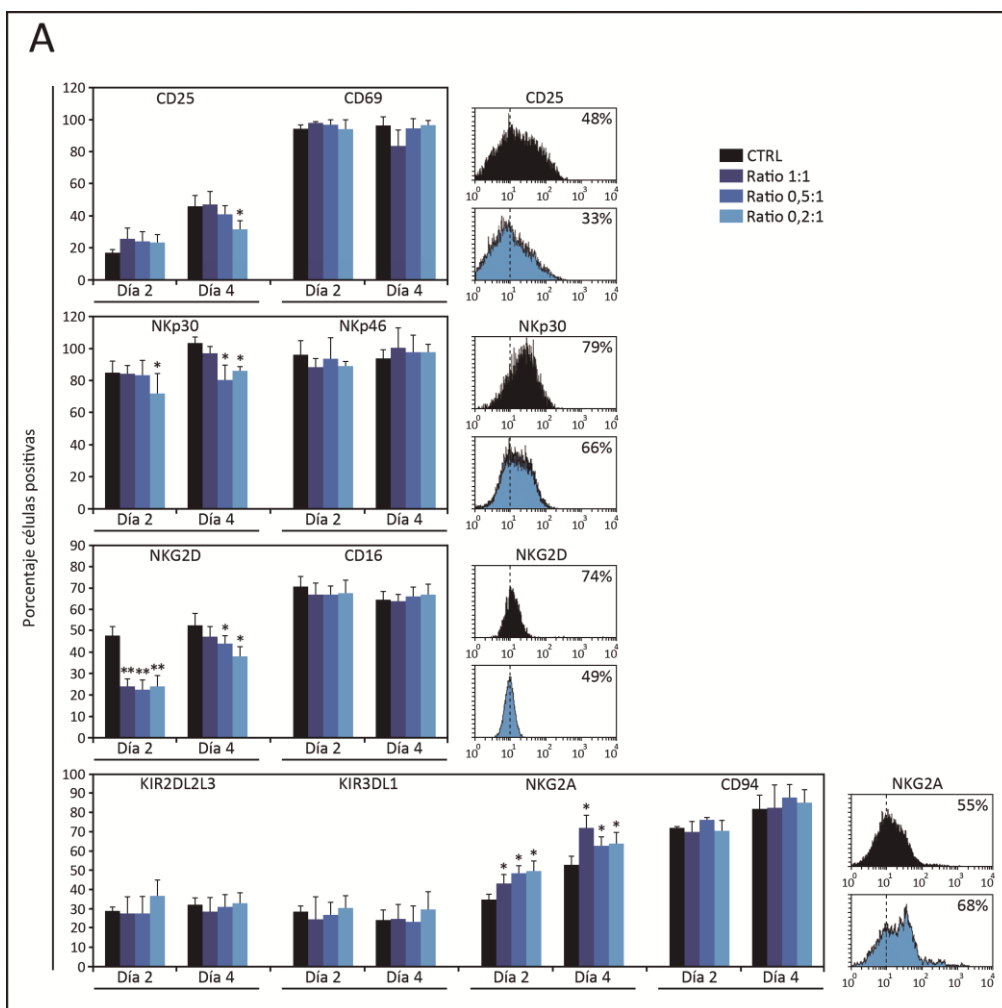
## 7.2. Las células NK modifican su patrón de expresión de receptores tras contacto con las células leucémicas.

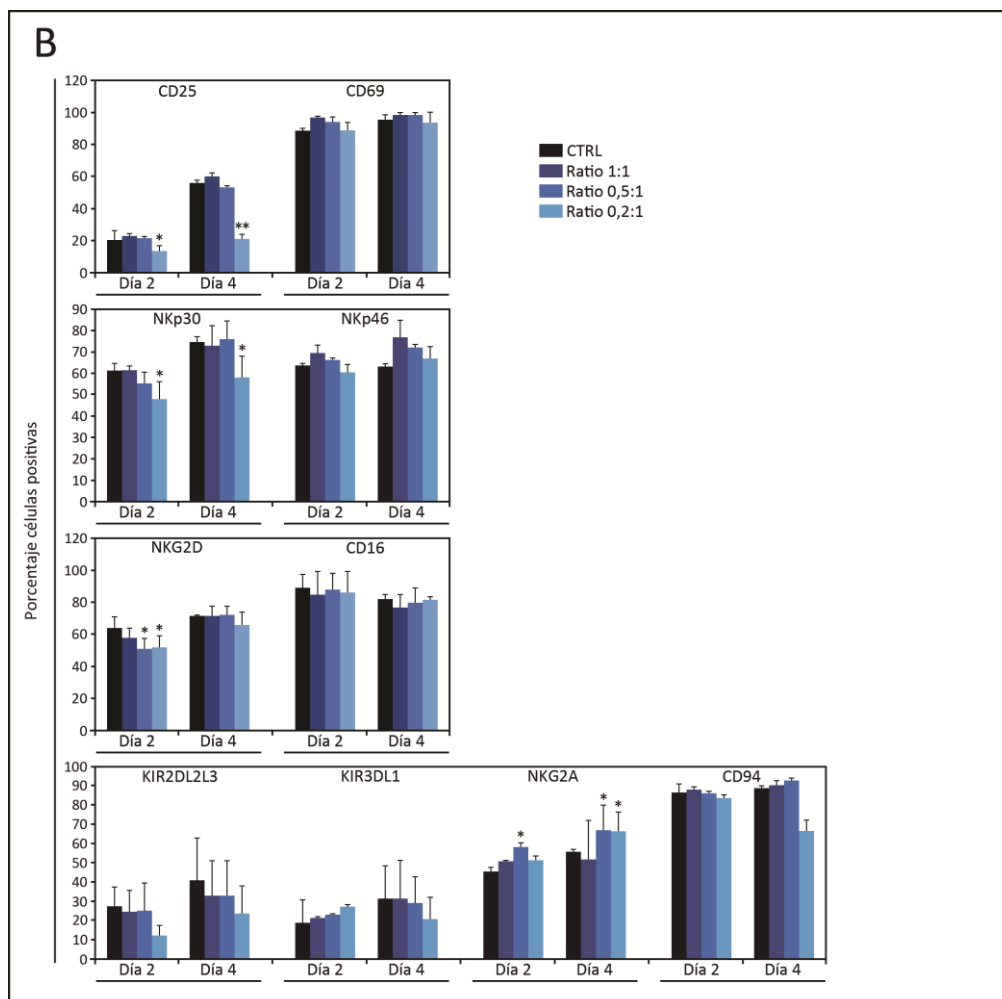
Con el fin de determinar si la presencia de las células leucémicas era responsable directa de los cambios observados en el perfil de expresión de receptores de las células NK, y puesto que el número de células NK recuperadas de los pacientes hacía inviable cualquier estudio funcional con ellas, llevamos a cabo una aproximación *in vitro* utilizando células NK de donantes sanos cultivadas con células de líneas leucémicas simulando lo que sucedería en el contexto de la enfermedad.

Se establecieron así cocultivos de células NK de donantes sanos y las líneas leucémicas NALM6 y TOM1 a diferentes ratios célula NK: célula leucémica y durante diferentes tiempos de cultivo.

El análisis por citometría de flujo reveló cambios en el fenotipo de las células NK. Así, la presencia tanto de la línea leucémica NALM6 (Figura 36A) como de TOM1 (Figura 36B) a ratios bajas, redujo la regulación positiva del marcador de activación celular CD25, especialmente tras contacto prolongado. Del mismo modo se observó una reducción en los niveles de expresión de los receptores NKp30 y NKG2D, que en el caso de este último fue mayor en presencia de NALM6. Junto a esta reducción en la expresión de los receptores de

activación, se produjo un incremento de los de inhibición, en particular de NKG2A, a tiempos prolongados de interacción con ambas líneas.



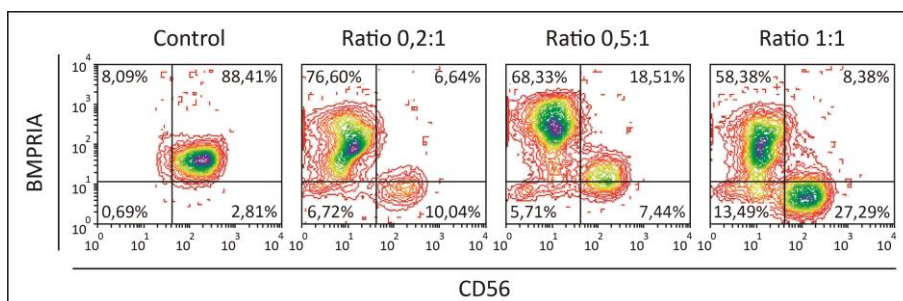


**Figura 36: La presencia de células leucémicas modifica el perfil fenotípico de las células NK.** Análisis mediante citometría de flujo de diferentes marcadores de superficie relacionados con la funcionalidad de las células NK, tras contacto durante dos y cuatro días con las líneas leucémicas NALM6 (A) y TOM1 (B), a diferentes ratios célula NK: célula leucémica. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar del porcentaje de células positivas para las diferentes moléculas estudiadas. Los histogramas muestran el porcentaje de células positivas para los marcadores que experimentan cambios más drásticos. Se han representado los datos correspondientes a entre dos y cuatro experimentos independientes (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; comparación frente a células NK cultivadas en condiciones control).



### 7.3. La presencia de la línea leucémica NALM6 reduce la expresión del receptor BMPRIA en las células NK.

Como se describe en el apartado anterior, el estudio de las células NK de los pacientes indicaba una reducción en la expresión del receptor BMPRIA, que podría estar relacionada con una menor funcionalidad de estas células. Por ello y para completar el estudio anterior, analizamos también la expresión de este receptor en las células NK tras cultivarlas con la línea leucémica NALM6. Como se muestra en la Figura 37, cuando la activación de las células NK acontecía en presencia de las células leucémicas no se producía la regulación positiva del receptor para BMP4, BMPRIA, siendo este efecto más evidente en la ratio más alta.



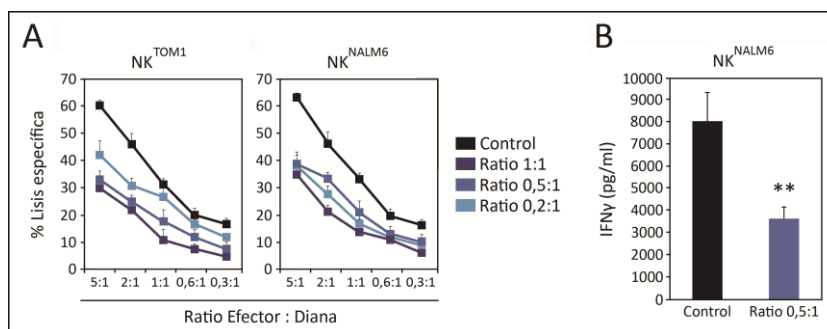
**Figura 37: Reducción en la expresión del receptor BMPRIA en las células NK tras contacto con la línea leucémica NALM6.** Estudio por citometría de flujo de los niveles de expresión del receptor BMPRIA en las células NK tras contacto durante dos días con la línea leucémica NALM6 a las ratios indicadas. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de un total de 4 experimentos independientes, en los que se indica el porcentaje de células NK definidas en base a la expresión del marcador CD56.

### 7.4. Los cambios fenotípicos en las células NK producidos como consecuencia del contacto con las células leucémicas provocan una reducción en la capacidad funcional de las primeras.

Para confirmar si estos cambios en el fenotipo tendrían alguna repercusión funcional, se estudió la capacidad citotóxica así como la producción de IFN $\gamma$  de las células NK tras contacto con las células leucémicas a las ratios y tiempos indicados.

El análisis de la capacidad lítica de estas células frente a la línea K562 mostró una reducción progresiva de ésta a medida que se incrementaba la ratio célula NK: célula leucémica. Dicha reducción fue evidente tanto cuando se había cultivado previamente con la línea TOM1

como con la NALM6, si bien en este último caso se observaron cambios significativos con cualquiera de las ratios utilizados (Figura 38A). Asimismo, la producción de IFN $\gamma$  fue significativamente menor en los cultivos de las células NK tras contacto con la línea leucémica NALM6 (Figura 38B).



**Figura 38: Disminución de la capacidad funcional de las células NK tras contacto con las células leucémicas.** (A) Análisis de la capacidad citotóxica de las células NK frente a la línea tumoral K562, tras contacto de las primeras con las células leucémicas TOM1 o NALM6 durante dos días y a las ratios indicadas. La gráfica representa la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro experimentos independientes. Se compararon las ratios célula efectora: célula diana 1:2, 1:1 y 1:0,6 encontrándose diferencias con una significación superior a 0,05 frente al control en las ratios célula NK: célula leucémica 0,5:1 y 1:1. (B) Determinación mediante ELISA de los niveles de producción de IFN $\gamma$  por las células NK tras dos días de cultivo con la línea leucémica NALM6. Los datos muestran la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; comparación frente a células NK cultivadas en condiciones control).



**DISCUSIÓN**



En la actualidad, cada vez son más numerosos los estudios que confirman la implicación de las células madre mesenquimales en el desarrollo y progresión de tumores sólidos y hematológicos. Estas células, procedentes de médula ósea entre otros tejidos, son atraídas hacia las zonas de formación tumoral, donde contribuyen a la creación de un microambiente específico que muchos autores han descrito como protumoral<sup>312</sup>. Entre las diferentes funciones desempeñadas por estas células en el nicho tumoral destacan, como han descrito estos autores, la estimulación de la proliferación celular<sup>313</sup>, el mantenimiento de la viabilidad<sup>314</sup> y la contribución a las capacidades migratoria<sup>315</sup>, angiogénica<sup>316</sup> y de evasión del sistema inmunitario de las células tumorales<sup>317</sup>. Sin embargo, en oposición a estos resultados, otros grupos han demostrado el efecto antitumoral de las MSCs, destacando el estudio con un modelo animal de cáncer de mama en donde, además de observar una reducción en la capacidad proliferativa de las células tumorales, se observa una reducción significativa de las metástasis en pulmón<sup>318</sup>.

El porqué de estos resultados contradictorios puede explicarse por la diferente metodología empleada en los estudios, con distintos modelos tumorales y MSCs aisladas de diferentes tejidos. Sin embargo, resulta determinante a la hora de explicar estos resultados el hecho de que en la mayor parte de estos trabajos se han empleado MSCs aisladas de donantes sanos que presumiblemente pueden tener un comportamiento diferente a las MSCs procedentes de pacientes. En este sentido, la información presente en la literatura respecto al comportamiento de las MSCs aisladas de pacientes, concretamente de aquellos con enfermedades hematológicas, es muy limitada y se centra principalmente en conocer aspectos como su capacidad de proliferación, diferenciación y contribución al mantenimiento de la hematopoyesis, sin hacer hincapié en un aspecto fundamental en la biología de estas células como es su potencial inmunomodulador.

Por ello, en el presente estudio, nuestro primer objetivo fue conocer las diferencias biológicas de las MSCs aisladas de pacientes pediátricos con LLA, haciendo especial énfasis en sus propiedades inmunomoduladoras sobre la población de células NK, por ser los principales agentes antitumorales de que dispone el organismo para hacer frente a la transformación tumoral.

Una primera aproximación a este objetivo fue determinar la existencia de alteraciones en aspectos básicos que caracterizan a estas células como es la expresión de determinados marcadores de superficie y su capacidad de diferenciación. En este sentido, las células aisladas de la médula ósea de los distintos pacientes en el momento del diagnóstico de la enfermedad y las de los donantes sanos, mostraron un fenotipo similar. En línea con estos resultados, aunque algunos estudios indican una reducción en la expresión de algunos marcadores en MSCs aisladas de pacientes con síndrome mielodisplásico<sup>319, 320</sup>, la mayor parte de los trabajos no han encontrado ninguna alteración en el fenotipo convencional asignado a estas células, si bien hay que tener en cuenta que los marcadores que las definen son poco específicos<sup>321, 322</sup>.

Asimismo, en lo que respecta a la capacidad de diferenciación, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las MSCs aisladas de pacientes en el momento del diagnóstico no presentan cambios significativos en su capacidad de diferenciación adipogénica u osteogénica respecto a las MSCs de donantes sanos, si bien su capacidad para diferenciar a adipocitos se incrementa durante el curso de la enfermedad presumiblemente en relación con el tratamiento quimioterápico y recuperándose al finalizar el mismo<sup>323</sup>. Los datos en la literatura en relación con el potencial de diferenciación de las MSCs aisladas de pacientes con patologías hematológicas son contradictorios. Así, mientras que algunos autores han reportado una menor capacidad osteogénica de las MSCs de pacientes con leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple<sup>324-326</sup>, la mayor parte de los trabajos describen la ausencia de alteraciones en el potencial de diferenciación de las MSCs de pacientes con patologías tales como síndrome mielodisplásico o linfoma Hodking y non-Hodking<sup>321, 322, 324</sup>. Estos resultados podrían sugerir un comportamiento diferente de estas células dependiendo de la enfermedad o del estado de la misma, si bien no podemos descartar tampoco que las diferencias descritas se deban al menos en parte, a los diferentes protocolos utilizados en los distintos trabajos para evaluar el potencial de diferenciación de estas células.

Centrándonos en su capacidad inmunomoduladora, los resultados obtenidos tras los cocultivos con las células NK muestran, al contrario de lo observado para MSC-DS, la capacidad de las MSCs aisladas de los pacientes en el momento del diagnóstico,

concretamente de aquellos incluidos en los grupos de riesgo bajo/intermedio, de estimular la actividad lítica de las células NK, superando incluso los valores exhibidos por estas células activadas en condiciones control. En concordancia con la mayor capacidad funcional, estas células presentan una mayor expresión de granzima y perforina, así como de los receptores de activación NKG2D y NKp30. Asimismo, este incremento de la actividad citotóxica se vió acompañado por el aumento en los niveles de producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , citoquinas proinflamatorias que median en el reclutamiento y activación de otras poblaciones celulares del sistema inmunitario. Estos efectos no se deben en ningún caso a una sensibilidad diferencial de las MSCs de donantes sanos y de pacientes a la lisis mediada por las células NK ya que exhiben similar susceptibilidad a la misma. Destaca finalmente que los cambios observados en las MSCs de los pacientes de LLA permanecen en ausencia de contacto con las células leucémicas.

En oposición los resultados observados en los cultivos con las MSCs aisladas de pacientes con LLA de riesgo bajo o intermedio de recaída, las MSCs aisladas de los pacientes con LLA de mayor riesgo mostraron un comportamiento inmunosupresor similar al de MSCs de donantes sanos, reduciendo significativamente la capacidad lítica de las células NK.

Los escasos estudios que analizan el potencial inmunomodulador de las MSCs aisladas de pacientes con diferentes patologías hematológicas se han centrado fundamentalmente en el impacto de estas sobre la funcionalidad T. Efectos inmunomoduladores similares a los descritos aquí sobre la población de linfocitos han sido descritos por otros grupos de investigación que apuntan que, a diferencia de las MSCs de donantes sanos, las MSCs de pacientes con diferentes enfermedades hematológicas son incapaces de bloquear la proliferación y activación de linfocitos T, manteniendo la expresión de los diferentes marcadores de activación en unos niveles similares a los que presentaban los linfocitos cultivados en ausencia de MSCs<sup>97, 99, 327, 328</sup>. Únicamente el grupo de Conforti y colaboradores observó un comportamiento de las MSCs de pacientes con LLA similar al de las MSCs de donantes sanos, si bien en este estudio los cocultivos se realizaron con la población total de PBMCs de sangre periférica en lugar de linfocitos T purificados<sup>101</sup>.



Por otro lado, en línea con estos resultados, los estudios realizados recientemente con MSCs de pacientes con síndrome mielodisplásico muestran ya diferencias en la capacidad proliferativa, supervivencia, capacidad de diferenciación osteogénica y producción de citoquinas entre pacientes con mejor pronóstico frente a los de peor pronóstico <sup>104, 110</sup>. Entre estos estudios cabe destacar los resultados obtenidos por Wang y colaboradores que observaron, en correlación con nuestros resultados, como las MSCs aisladas de los pacientes con menor riesgo de recaída eran capaces de inducir la maduración de células dendríticas, estimulando su actividad, mientras que aquellas aisladas de pacientes de riesgo alto mantenían las células dendríticas en un estadio de diferenciación inmaduro que inducía tolerancia inmunitaria <sup>111</sup>.

En conjunto, estos resultados sugieren un comportamiento diferente de las MSCs de pacientes con enfermedades hematológicas dependiente del riesgo de recaída, lo que podría ser determinante en el control y progresión de la enfermedad. Así, las MSCs de pacientes con mejor pronóstico modificarían su capacidad inmunomoduladora para potenciar la acción del sistema inmunitario y frenar el avance de la enfermedad.

Adicionalmente, nuestros resultados muestran que, a medida que se avanza en el tratamiento de la enfermedad, las MSCs aisladas de los pacientes en estos momentos presentan progresivamente un comportamiento más semejante a las MSCs de donantes sanos y por lo tanto inmunosupresor. Estas observaciones parecen sugerir fuertemente que la adquisición de las propiedades immunoestimuladoras de las MSCs del nicho medular son inducidas por la presencia de las células leucémicas y, por tanto, la renovación del componente estromático durante el tratamiento quimioterápico, ya sin la presencia de la leucemia, justificaría el cambio de comportamiento de las MSCs aisladas de los pacientes en estos momentos de la enfermedad o de pacientes recuperados fuera de tratamiento. En este sentido, nuestros resultados muestran cómo, ante la presencia de la línea leucémica NALM6, las MSCs aisladas de donantes sanos modifican su comportamiento inmunosupresor y son capaces de estimular la actividad citotóxica de las células NK de forma similar a como lo hacen las MSCs de pacientes con LLA. Estos cambios inducidos por la LLA se deben, al menos en parte, a una reducción en la producción del factor inmunosupresor TGF- $\beta$  por parte de las MSCs. La capacidad de las MSCs de responder a la

presencia de las células tumorales ha sido descrita previamente por otros autores. Así, la presencia de células aisladas de pacientes con síndrome mielodisplásico estimula la producción de factores como VEGFA, LIF e IGFBP2 en las MSCs <sup>26</sup>. Asimismo, las MSCs incrementan la producción de IL6, IL10 y HGF entre otros factores ante la presencia de células de mieloma múltiple <sup>329-331</sup>. Sin embargo, ninguno de estos trabajos analiza cómo afectan estos cambios en el secretoma de las MSCs a su capacidad inmunomoduladora.

El análisis de los mecanismos responsables del comportamiento inmunoestimulador de las MSCs de los pacientes con LLA reveló la implicación tanto de factores solubles como de moléculas mediadoras en la interacción célula-célula. En concordancia con la reducción de la producción de TGF- $\beta$  por las MSCs de donantes sanos tras contacto con las células leucémicas, encontramos que las MSCs aisladas en el momento del diagnóstico presentaban también una producción reducida de esta citoquina. De manera similar, Zhao y colaboradores observaron este mismo hecho en MSCs aisladas de pacientes con síndrome mielodisplásico <sup>327</sup>. TGF- $\beta$  es una proteína perteneciente a la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante Beta producida por diferentes células y que desempeñan muy diversas funciones relacionadas principalmente con la respuesta inmunitaria. Regula la proliferación, diferenciación, apoptosis y migración de células del sistema inmunitario pero también de células tumorales, de ahí que su incremento, detectado en distintos tipos de cáncer, se haya relacionado con un mal pronóstico de la enfermedad. En esta línea, la activación de la vía de señalización TGF- $\beta$ /Smad se ha observado como un mecanismo importante llevado a cabo por las células de leucemia linfoblástica aguda para evadir la acción de las células NK <sup>332</sup>. Asimismo, también es responsable de la inducción de MMP-9, metaloproteinasa que participa en la degradación de la matriz extracelular favoreciendo el reclutamiento de las células madre leucémicas a la médula ósea en la leucémica mieloide crónica <sup>333</sup>.

Junto con TGF- $\beta$ , los niveles de PGE2 también fueron significativamente inferiores en los sobrenadantes de las MSCs de los pacientes con LLA. Esta prostaglandina es otro de los factores solubles ampliamente implicado en los efectos inmunosupresores de las MSCs <sup>180, 181, 334</sup>. Sus efectos incluyen entre otros, la reducción de la actividad citotóxica y producción de citoquinas de las células NK <sup>181</sup>, además de bloquear la capacidad antitumoral de las

células dendríticas a través de un mecanismo mediado por IDO1<sup>334</sup>. Por otro lado, PGE2 a través de su interacción con la enzima COX2 está implicada en la resistencia a las células leucémicas a la apoptosis, al incrementar la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL y reducir la de proteínas pro-apoptóticas<sup>335</sup>.

Por lo tanto, la producción reducida de TGF- $\beta$  y PGE2 por las MSCs de los pacientes con LLA no solamente podría ser responsable de abolir los efectos inmunosupresores de las MSCs al menos sobre las células NK, sino que también podría reducir las posibilidades migratorias y de supervivencia de las células tumorales.

Por otra parte, nuestros resultados muestran una producción incrementada por las MSCs aisladas de pacientes con LLA de diferentes factores proinflamatorios entre los que se incluyen la citoquina IL6, así como las quimioquinas IL8, CCL2, CCL5 y CXCL10. En línea con nuestros resultados otros autores también han encontrado mayores niveles de producción de estos factores por MSCs aisladas de pacientes con mieloma múltiple<sup>97, 98, 109, 329</sup>, leucemia mieloide crónica<sup>305, 336</sup>, leucemia mieloide aguda<sup>102, 337</sup>, leucemia linfocítica crónica<sup>306, 338, 339</sup> y leucemia linfoblástica aguda<sup>304</sup>. Estos trabajos sin embargo se han centrado principalmente en el análisis del impacto directo del incremento de estos factores en la supervivencia, proliferación, migración e invasión de las células tumorales sin abordar su relevancia en la respuesta inmunitaria de estos pacientes<sup>304-306, 329, 336, 338, 340-346</sup>.

IL6 es una citoquina pleiotrópica, producida entre otros tipos celulares por las MSCs. Esta citoquina es capaz de actuar sobre diferentes células del sistema inmunitario como monocitos, linfocitos T y linfocitos B<sup>347</sup>. En relación a su papel sobre las células NK, se ha descrito su capacidad para incrementar la actividad lítica y tasa proliferativa de estas células<sup>348, 349</sup>. Más recientemente Lin y colaboradores han descrito que la presencia de IL6, en combinación con IL15, es capaz además de inhibir el efecto inmunosupresor de TGF- $\beta$  y recuperar la capacidad lítica de las células NK<sup>350</sup>. En este sentido, si bien nuestros resultados apuntan niveles de expresión de IL15 similares entre las MSCs de pacientes y de donantes sanos, una producción significativamente incrementada de IL6 por las primeras podría favorecer la reducción de TGF- $\beta$  observada en nuestro estudio y por lo tanto el

incremento de la actividad lítica de las células NK en presencia de las MSCs aisladas de los pacientes.

Asimismo, las quimioquinas CCL2 y CXCL10 aquí analizadas participan en el reclutamiento de diferentes células del sistema inmunitario al nicho tumoral; sin embargo, los estudios referidos a su efecto sobre la funcionalidad de estas poblaciones son muy escasos. En esta línea, Zhou y colaboradores han descrito que MSCs aisladas de médula ósea de donantes sanos son capaces de incrementar, a través de un mecanismo mediado por CCL2, la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> cuando la ratio MSC: célula respondedora es baja<sup>351</sup>. Los resultados descritos en el presente trabajo ponen de manifiesto una producción significativamente incrementada de CCL2 por las MSCs de los pacientes con LLA, lo que podría favorecer su capacidad inmunoestimuladora en el contexto de la leucemia.

La producción de IL7 y CXCL12 se encontró significativamente reducida en las MSCs de los pacientes de LLA. Ambas citoquinas participan en la homeostasis hematopoyética regulando el mantenimiento y la diferenciación de los progenitores hematopoyéticos hacia los diferentes linajes incluyendo el linaje B<sup>39, 352</sup>. Por lo tanto, la producción reducida de estos factores en la médula ósea de los pacientes de LLA podría explicar al menos en parte, la ventaja de la supervivencia de las células leucémicas frente a los progenitores hematopoyéticos descrita por nuestro grupo<sup>323</sup>. Resultados similares a lo descrito en este trabajo para CXCL12 han sido reportados por el grupo de Van der Berk en una cohorte de 151 pacientes de LLA y por el grupo de Bhatia en pacientes de leucemia mieloide crónica. Según estos trabajos la reducción en los niveles de CXCL12 en la médula ósea es consecuencia directa de la presencia de la leucemia y provoca un drástico incremento en la producción de G-CSF. Esta condición sería responsable de la migración de las células tumorales desde la médula ósea hacia otros tejidos como el bazo, donde sus niveles de CXCL12 aparecen incrementados favoreciendo así la metástasis<sup>353, 354</sup>.

Los mecanismos que subyacen al comportamiento inmunomodulador diferencial de las MSCs de pacientes de LLA respecto a las MSCs de donantes sanos incluyen, junto con los cambios en los factores solubles antes descritos, variaciones en el patrón de expresión de diferentes moléculas de membrana. Concretamente, las MSCs de los pacientes exhiben un

incremento en los niveles de expresión de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD86, así como una reducción en los ligandos de PD-1, PD-L1 y PD-L2, lo que correlaciona con la pérdida de su capacidad inmunosupresora. Por el contrario, no observamos ninguna modificación en la expresión de HLA-DR en estas células que siguieron siendo mayoritariamente negativas al igual que las MSCs de donantes sanos. Si bien la ausencia de moléculas del Complejo de Histocompatibilidad de Clase II es una característica típica de las MSCs, bajo determinados condicionamientos como es el pretratamiento con IFN $\gamma$ , se induce su regulación positiva pudiendo llegar a actuar, según algunos autores, como verdaderas células presentadoras de antígeno<sup>355, 356</sup>. Sin embargo, en correlación con nuestros resultados, tampoco ha sido descrita hasta el momento la regulación positiva de las moléculas de HLA-II en el estroma medular de otras patologías hematológicas. Por el contrario, la regulación positiva de la expresión de la molécula coestimuladora CD40 observada en las MSCs de LLA, ha sido también descrita en células del estroma medular en otros modelos de enfermedades hematológicas como mieloma múltiple o linfoma de zonas marginales<sup>109, 357</sup>. Aunque hasta el momento no ha sido estudiado directamente su impacto en la capacidad inmunomoduladora de las MSCs, la interacción de estas a través de CD40 con diferentes células del sistema inmunitario que expresan el ligando CD40L, promovería la activación de la respuesta inmune contra el tumor. En este sentido, ha sido descrito que la vía dependiente de CD40 es también funcional en células NK efectoras *in vivo* tras la activación con estímulos que incluyen entre otros, células tumorales<sup>358</sup>.

En relación con el eje PD-1/PD-L1, su marcado carácter inmunosupresor determina su implicación en el desarrollo de procesos tumorales como un mecanismo de las células tumorales para evadir la respuesta inmunitaria del organismo. Así, la activación de la señalización PD-1/PD-L1 conduce a la inactivación de las células NK en mieloma múltiple donde la reducción de la funcionalidad de estas células se ha asociado a un incremento en la expresión de PD-1 en membrana, favoreciendo la interacción con los ligandos<sup>158, 359</sup>. Igualmente, el bloqueo de dicha interacción tanto *in vitro* como *in vivo* es responsable del aumento de la capacidad citotóxica de las células NK contra las células tumorales<sup>158, 360</sup>. Precisamente, la implicación del eje PD-1/PD-L1 ha sido relacionada en diferentes trabajos con la inmunosupresión inducida por las MSCs sobre los linfocitos T<sup>361</sup>. Por tanto, la regulación negativa de la expresión de los PD-Ls observada en las MSCs de los pacientes de

LLA podría tener un impacto positivo en la función de las células NK de dichos pacientes contribuyendo así a la eliminación del tumor.

En relación a la expresión de los TLRs en las MSCs, su expresión basal varía dependiendo del origen de dichas células, siendo característica en el caso de MSCs aisladas de médula ósea, la expresión de TLR3 y TLR4<sup>362</sup> (nuestros resultados). Diferentes trabajos han puesto de manifiesto el papel de estos receptores en la respuesta de las MSCs ante diferentes estímulos de daño ya que la estimulación de los mismos parece regular el reclutamiento, la migración y las capacidades inmunomoduladoras de las MSCs en reparación tisular, procesos inflamatorios, infecciones o cáncer<sup>363, 364</sup>. En este sentido, la estimulación a través de TLR4 promueve la supervivencia e induce la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias por las MSCs bloqueando su actividad inmunosupresora y restaurando así una respuesta inmune eficaz en diferentes condiciones patológicas<sup>64, 82, 363, 364</sup>. Asimismo, ha sido descrito que la estimulación de las MSCs a través de TLR4, en un microambiente inflamatorio, induce la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40<sup>362</sup>. En correlación, nuestros resultados indican que las MSCs de pacientes de LLA exhiben una expresión significativamente incrementada de TLR4 pero no de otros TLRs (incluyendo TLR3) respecto a las MSCs aisladas de donantes sanos y, como se ha mencionado anteriormente, expresan asimismo moléculas como CD40 relevantes para su función inmunoestimuladora. Presumiblemente este conjunto de cambios dotaría a las MSCs de propiedades antitumorales como ha sido sugerido por Waterman y colaboradores utilizando un modelo de ratón de cáncer de ovario. Los autores en este trabajo demuestran cómo la inyección de MSCs estimuladas vía TLR4, denominadas MSC1 o proinflamatorias, inhibe el crecimiento tumoral mientras que, por el contrario, la inyección de células estimuladas vía TLR3 o MSC2/antiinflamatorias favorecía el desarrollo, migración e invasión de las células tumorales<sup>82</sup>. Asimismo, Lu y colaboradores describen un incremento en la expresión de TLR4 en MSCs aisladas de la médula ósea de pacientes de leucemia mieloide aguda y cáncer de pulmón. En este caso sin embargo, los autores sugieren que este incremento de la señalización TLR4 estaría relacionado con una inhibición de la actividad citotóxica de las células NK<sup>183</sup>.

Nuestros resultados indican una cinética paralela entre la expresión de TLR4 y el ligando para Notch1, Jagged-1, en las MSCs de los pacientes de LLA a lo largo de la enfermedad. Ambos alcanzan una expresión máxima en las MSCs aisladas en el momento del diagnóstico. La interacción entre las vías de señalización TLR4 y Notch1 ha sido descrita en diferentes tipos celulares y en la mayoría de los sistemas estudiados la estimulación de la señal Notch1 modula la producción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a la estimulación con LPS<sup>365</sup>. Más controvertidos son los resultados en relación con las MSCs ya que, mientras que el grupo de Liotta describe que la estimulación tanto de la vía de señalización TLR3 como TLR4 provoca una regulación negativa de Jagged-1 en las MSCs<sup>64</sup>, Waterman y colaboradores demuestran, en concordancia con nuestros resultados, un incremento paralelo de ambas vías y en consecuencia la adquisición de un fenotipo proinflamatorio MSC1<sup>82</sup>. En apoyo a estos resultados, nuestros datos muestran que la inhibición de la vía Notch1, relevante para la función NK<sup>307, 309</sup>, provoca la neutralización de los efectos inmunoestimuladores de las MSCs de los pacientes, lo que sugiere que al menos parcialmente, Jagged-1 está implicado en la capacidad de las MSCs aisladas en el momento del diagnóstico para estimular la actividad antitumoral de las células NK.

El conjunto de cambios observados en las MSCs de los pacientes de LLA de riesgo bajo o intermedio en el momento del diagnóstico estaría entonces dirigido a potenciar su actividad antitumoral induciendo una respuesta inmune más eficaz. Estos resultados sugieren que estas células del microambiente también contribuyen a la característica clínica de enfermedad con bajo riesgo de recaída dando así una nueva perspectiva a la implicación del microambiente tumoral en el desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda. Trabajos publicados en los últimos años en el campo de los tumores sólidos, subrayan el papel crítico del sistema inmunitario del paciente a la hora de modular la progresión tumoral. Así, diferentes ensayos clínicos se han encamidado a evaluar el valor pronóstico y predictivo del infiltrado inmune en el contexto del tumor sólido, conocido como *immunoscore*<sup>366, 367</sup>. Los resultados obtenidos se están traduciendo ya en la inclusión de biomarcadores inmunes como herramienta para predecir el pronóstico y la respuesta a la terapia, de manera independiente a los factores pronósticos histopatológicos clásicos<sup>368, 369</sup>. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo con las MSCs de pacientes de LLA de bajo riesgo *versus* riesgo alto, como elementos del microambiente capaces de modular la respuesta inmune, van en

esta misma dirección, si bien se requiere desarrollar los estudios sobre una cohorte de pacientes mayor para evaluar su valor pronóstico y predictivo.

En los últimos años, cada vez un mayor número de trabajos destacan la importancia de la vía de señalización BMP en el desarrollo tumoral, habiéndose descrito, como ya hemos señalado en apartados anteriores, efectos tanto pro- como antitumorales. La mayor parte de estos trabajos sin embargo, se han centrado en el estudio del impacto directo de las BMPs sobre la población de células tumorales, sin analizar sus efectos sobre otros componentes celulares presentes en el contexto tumoral. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado la relevancia de BMP4 en la funcionalidad de distintas células del sistema inmunitario<sup>251, 255, 256</sup> que forman parte del microambiente tumoral.

En este trabajo analizamos la expresión de los diferentes componentes de la vía de señalización BMP2/4 en las MSCs de los pacientes como una primera aproximación al estudio de la implicación de la misma en la adquisición de las propiedades inmunoestimuladores de estas células estromáticas. Como muestran nuestros resultados, tanto las MSCs aisladas de donantes sanos como de pacientes de LLA (tanto en el momento del diagnóstico como a distintos tiempos a lo largo del tratamiento), expresan todos los componentes necesarios para la activación de la vía sin que existan diferencias reseñables en los niveles de expresión génica para receptores, proteínas Smads o proteínas I $\kappa$ B en las diferentes muestras.

Un hallazgo importante de nuestro trabajo fue el hecho de que las MSCs de los pacientes, concretamente aquellas aisladas en el momento del diagnóstico, produjeran grandes cantidades del ligando BMP4 en comparación con las muestras de donantes sanos y del grupo de pacientes de alto riesgo. Esta producción se reduce a medida que se avanza en el tratamiento de la enfermedad, describiendo una cinética que correlaciona con los cambios en las propiedades inmunomoduladoras descritas anteriormente. Este incremento de BMP4 observado podría ser consecuencia del perfil proinflamatorio de las MSCs de estos pacientes. En este sentido, ha sido descrita la inducción de la expresión de BMPs en distintos tipos celulares tras estimulación con diferentes citoquinas proinflamatorias como IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  o IL6 así como tras activación de la vía de señalización TLR<sup>370-372</sup>, señales todas



ellas incrementadas en las MSCs de los pacientes de LLA como ya hemos comentado anteriormente.

Otros autores han encontrado este mismo aumento en la producción de BMPs por parte de células del estroma en pacientes con leucemia mieloide aguda y con carcinoma de ovario<sup>265, 373, 374</sup>, si bien en estos casos no se analizaron las posibles diferencias entre pacientes de riesgo bajo/intermedio de recaída y pacientes de riesgo alto, ni se determinó su implicación en la función de estas células en el contexto tumoral. En nuestro estudio, el tratamiento de las MSCs de los pacientes con DMH1, un inhibidor específico de la vía canónica de la señalización BMP2/4, bloqueó la capacidad de estas para estimular la funcionalidad de las células NK. Además, la adición exógena de BMP4 a MSCs de donantes sanos incrementó la expresión de Jagged-1 y de moléculas coestimuladoras recreando parcialmente el fenotipo de las MSCs de los pacientes.

Estos resultados sugieren que BMP4 podría ser otro factor adicional que contribuye a la adquisición de las propiedades inmunomoduladoras diferenciales de las MSCs de los pacientes de LLA de riesgo bajo o intermedio de recaída.

En línea con estos datos, nos planteamos si BMP4, además de contribuir a la capacidad inmunomoduladora de las MSCs del estroma medular, podría estar ejerciendo acciones sobre la población de células leucémicas, favoreciendo o inhibiendo su escape a la acción del sistema inmunitario.

Los análisis de expresión génica de los distintos componentes de la vía BMP en dos líneas de LLA, NALM6 y TOM1, de riesgo bajo y alto respectivamente, pusieron de manifiesto diferencias entre ellas que podrían sugerir una activación diferencial de dicha vía dependiendo del riesgo de recaída de la leucemia como fue sugerido previamente por nuestro grupo<sup>375</sup>. Así, en la línea leucémica de riesgo alto TOM1 encontramos niveles de expresión elevados para el receptor ActRIA pero muy bajos o indetectables para los receptores BMPRIA y BMPRIB. Asimismo, se observó una expresión muy reducida en los niveles de la proteína BR-Smad Smad1, en paralelo a la elevada expresión de la Smad inhibidora Smad6 y altos niveles de antagonista soluble Noggin. Estos resultados podrían

sugerir que en leucemias de alto riesgo, como es la línea TOM1, la vía de señalización canónica de BMP4 está inhibida. Por el contrario, el análisis de los componentes en la línea de bajo riesgo NALM6, mostró niveles mayores de expresión del receptor BMPRIA y de la proteína transductora de la señal Smad1 que, junto a la ausencia de Noggin, sugería que en esta línea BMP4 señalizaría principalmente a través de la ruta canónica. En este sentido, mientras que la línea LLA TOM1 fue refractaria a la adición de BMP4, la línea NALM6 mostró una reducción significativa de su tasa proliferativa en respuesta a la presencia del factor en el medio de cultivo.

Diferencias en la expresión de los componentes de la vía BMP en células leucémicas se han correlacionado previamente con el pronóstico de la enfermedad. Concretamente, en células mononucleares aisladas de sangre periférica de pacientes de LLC tipo B se detectaron mayores niveles de expresión de los receptores BMPRIA, BMPRIB y BMPRII en aquellos pacientes con peor pronóstico <sup>274</sup>. Asimismo, en pacientes de leucemia mieloide crónica una peor supervivencia se ha correlacionado también con un incremento en la expresión de BMPRIB junto con una reducción de Smad1, Smad4, Smad6 e Id2 en las células mononucleares de médula ósea <sup>265</sup>. Por el contrario, y en consonancia con los resultados obtenidos en este trabajo con las líneas LLA de bajo y alto riesgo, los estudios en pacientes con leucemias agudas, tanto de origen linfóide como mieloide, muestran la asociación entre un incremento en la expresión de los receptores BMPRIA, BMPRIB y BMPRII y una mejor respuesta al tratamiento, junto con un menor riesgo de recaída en la enfermedad <sup>273, 375</sup>. Datos de nuestro grupo sugieren así mismo una correlación entre la señalización activa de la vía canónica para BMP2/4 en la célula leucémica y un pronóstico favorable de los pacientes de LLA <sup>376</sup>.

Diferencias en la regulación de la proliferación y supervivencia celular por BMP4 también han sido descritas por otros grupos de investigación en diferentes tumores hematológicos. Concretamente, los estudios realizados por Takahashi y colaboradores mostraron cómo la estimulación exógena con BMP4 reducía la capacidad proliferativa de la línea celular de linfoma-B Daudi, al igual que habíamos observado nosotros con NALM6; mientras que en otras líneas celulares, entre ellas la línea LLA-T DND-41 y la línea LMA NB4, como ocurría

con TOM1, no se observó ningún efecto. Por el contrario, en las líneas LLA-T Jurkat y KOPT-K1 y la línea de linfoma-B TMD8, la adición de BMP4 estimuló su proliferación <sup>294</sup>.

Esta diferente respuesta a la estimulación con BMP4 puede deberse a la expresión diferencial de los distintos receptores, que condicionan la afinidad por el ligando así como la señal que se transduce, pudiendo inducir una respuesta diferente. Asimismo, diferentes autores han atribuido estas diferencias en la respuesta de las células tumorales al morfógeno a la existencia de diferentes clones celulares dentro de la población total que responderían de manera distinta. Ya a mediados de los años 50 surgió la teoría de la existencia de una subpoblación de células tumorales indiferenciadas dentro de la masa tumoral, responsables de iniciar el desarrollo tumoral. Sin embargo, no fue hasta 1994 que no se confirmó la presencia de dichas células, denominadas células madre leucémicas, en un modelo murino de leucemia mieloide aguda desarrollado por Lapidot y colaboradores <sup>377</sup>. Posteriormente, a raíz de este descubrimiento, muchos estudios han confirmado la existencia de esta subpoblación de células madre tumorales en diferentes tumores sólidos y hematológicos <sup>378</sup>. Resultados preliminares de nuestro grupo muestran que entre un 2-4% de la población total de células de la línea leucémica NALM6 son negativas en un ensayo típico con Vybrant® DyeCycle™ Violet Stain, pudiendo constituir esta la población de LSCs. La adición exógena de BMP4 incrementó el número de LSCs presentes en el cultivo, reduciendo el resto de la población. Estudios de viabilidad y de proliferación celular sugieren que BMP4 tiene un efecto diferencial dependiente del estado de diferenciación de las células leucémicas, inhibiendo la proliferación de la población leucémica mayoritaria LSC<sup>-</sup> y estimulando la de las células más diferenciadas LSC, responsables del mantenimiento de la LLA. Resultados similares han sido obtenidos por otros grupos de investigación en estudios en carcinoma de ovario, donde la presencia de BMP2 producido por el estroma tumoral incrementó el porcentaje de células ALDH<sup>+</sup>, al aumentar su capacidad proliferativa <sup>373</sup>. Por el contrario, en glioblastoma, los elevados niveles de BMP producidos por las células del estroma favorecen la diferenciación de las CSCs. En respuesta a este efecto, estas células producirían grandes cantidades de Gremlin1 que bloquearía la acción de las proteínas BMP, manteniendo su fenotipo indiferenciado y facilitando las recaídas en la enfermedad

<sup>286</sup>.

La progresión de la célula tumoral en el individuo exige su adaptación al entorno agresivo que representa el sistema inmunitario. En los últimos 15 años este concepto de inmunovigilancia propuesto muchas décadas atrás, ha sido adaptado y refinado dando lugar a una teoría llamada *immunoediting*<sup>379, 380</sup>. Se trata de un proceso dinámico que transcurriría en tres etapas. En una primera fase conocida como eliminación, las células de la inmunidad innata y adaptativa son reclutadas al lugar de la inflamación donde eliminan los primeros clones de células transformadas. Aquellos clones capaces de sobrevivir a la acción del sistema inmunitario entran en una fase de equilibrio mediada por células de la inmunidad adaptativa, en la que su proliferación está controlada pudiendo mantenerse en esta etapa durante años. Finalmente, las células tumorales pueden escapar al control del sistema inmunitario y proliferar conduciendo al estadio en el que el tumor es clínicamente identificable. Este escape puede estar mediado por distintos mecanismos que incluyen entre otros, resistencia incrementada al reconocimiento de las células tumorales por el sistema inmunitario (menor inmunogenicidad) y, por lo tanto, a la lisis por las células efectoras y, al desarrollo de un microambiente tumoral inmunosupresor que favorecería la progresión tumoral<sup>381</sup>.

Como se señala en el apartado *Introducción* de este trabajo, las células NK juegan un papel fundamental en la eliminación de las células tumorales. Estas células de la inmunidad innata no reconocen células tumorales *per se*, sino que como en otros contextos como el de infecciones víricas detectan cambios en la célula blanco, de los niveles de expresión de moléculas del HLA-I o la regulación positiva de ligandos para sus receptores activadores NKG2D o NCRs, activando entonces su maquinaria lítica contra la célula tumoral y la producción de citoquinas que promueven la respuesta inmune adquirida. Sin embargo, las células tumorales desarrollan estrategias directas e indirectas que progresivamente pueden contrarrestar la acción de estos efectos antitumorales. En este sentido, producen factores solubles con función inmunosupresora entre los que se incluyen IDO, PGE2 o TGF- $\beta$ <sup>160, 382</sup>. Así, en glioblastoma, las células tumorales producen grandes cantidades de TGF- $\beta$  que reducen la expresión del receptor NKG2D, a la vez que liberan al medio LDH, induciendo la expresión de los ligandos para dicho receptor en células mieloides que infiltran el tumor, comprometiendo la función de las células NK<sup>382</sup>.

Dentro de las enfermedades hematológicas, uno de los mecanismos más usados por las células leucémicas para evadir la acción de las células NK es la reducción de la expresión de los ligandos para NKG2D en la membrana, bien por metilación, como se ha observado en leucemia mieloide aguda<sup>173</sup>, bien por su liberación directa al medio o a través de exosomas<sup>169</sup>. En este sentido, el incremento de ligandos para NKG2D solubles observado en pacientes con leucemia se ha demostrado que es responsable de la reducción en la expresión del receptor NKG2D en las células NK, relacionándolo con una peor supervivencia a la enfermedad<sup>170</sup>. Asimismo, Reiners y colaboradores comprobaron cómo el aumento de BAG6/BAT3, ligando para el receptor NKp30, en el suero de pacientes con leucemia linfoblástica crónica reducía la actividad citotóxica de las células NK, así como la expresión de CD16 y CD56 en su superficie<sup>383</sup>.

Por otro lado, las células leucémicas incrementan la expresión de moléculas HLA clásicas y no clásicas, que interaccionan con receptores de inhibición de las células NK<sup>174, 176</sup>. Entre ellas destaca la molécula HLA-G que puede presentarse de forma soluble o unida a membrana y cuyos niveles se han encontrado incrementados en diferentes tumores hematológicos como leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica y mieloma múltiple, comprometiendo la funcionalidad de células NK y linfocitos T CD8<sup>+</sup><sup>175, 384-387</sup>.

En nuestro modelo, nos planteamos si la producción incrementada de BMP4 por el estroma de la médula ósea de los pacientes de LLA, podía modificar la susceptibilidad a la lisis mediada por las células NK. Nuestros resultados muestran que las células NK son capaces de lisar a las células de la línea leucémica NALM6 y que además dicha susceptibilidad se ve incrementada tras la adición exógena de BMP4. Como mecanismo mediador de estos cambios en la susceptibilidad de las células, observamos que la estimulación con BMP4 incrementaba de manera significativa la expresión de los ligandos para los receptores NKG2D y NKp30, MICB, ULBP3 y B7H6 respectivamente sin afectar a la expresión de las moléculas HLA-A,B,C, HLA-G y HLA-E, ligandos de los receptores inhibidores. Por otro lado, al igual que ocurría en el estudio de proliferación y viabilidad, la presencia de BMP4 no indujo ningún cambio significativo en la expresión de los diferentes ligandos en la línea de alto riesgo TOM1, que además resultó ser resistente a la lisis mediada por estas células.

Por tanto, estos resultados apuntan por primera vez, un papel de BMP4 en la eliminación de las células leucémicas de LLA de bajo riesgo induciendo su sensibilidad a la lisis mediada por células NK. Estos resultados sugieren además diferencias en la respuesta inmunitaria dependiendo del riesgo de recaída en la enfermedad y un papel relevante de BMP4 en la modulación de esta. El estudio en muestras primarias, tanto de la expresión de los ligandos para las células NK como de la serpina PI9, inhibidora de la granzima B, confirma este extremo. En este sentido, observamos los mayores niveles de expresión de PI9 en las células de los pacientes incluidos en el grupo de alto riesgo. Presumiblemente las células tumorales de estos pacientes presentarían una mayor resistencia a la lisis mediada por células NK al ser capaces de contrarrestar la acción de la granzima B favoreciéndose así la progresión del tumor. En línea con estos resultados, Ray y colaboradores observaron un incremento de dicha serpina en líneas celulares de cáncer de próstata, incremento que según los autores, favorecería la progresión tumoral<sup>388</sup>. La interacción B7H6-NKp30 induce la activación de la célula NK facilitando su acción lítica sobre la célula blanco. De esta forma, la expresión del ligando activador B7H6 correlacionaría con un mejor pronóstico de la enfermedad, como se ha observado en estudios realizados en cáncer de ovario<sup>144</sup>. En nuestro estudio observamos una reducción en la expresión de B7H6 en las células leucémicas de los pacientes que habían recaído en la enfermedad, especialmente en aquellos que inicialmente habían sido incluidos en los grupos de riesgo bajo o intermedio. En consecuencia, si bien es necesario corroborar estos datos en un mayor número de pacientes, el análisis de la expresión de este ligando en el momento del diagnóstico de la enfermedad podría identificar a un grupo de pacientes que si bien, en base a otras características se incluyen en grupos con menor riesgo de recaída recibiendo un tratamiento menos agresivo, deberían adscribirse al grupo de riesgo alto, recibiendo un tratamiento más eficaz. Asimismo, esta menor expresión del ligando podría venir determinada por una reducción en los niveles de BMP4 en el microambiente medular de estos pacientes en comparación con otros del grupo de riesgo bajo/intermedio que no hubiesen recaído, si bien esto no ha sido confirmado hasta el momento.

En lo que se refiere a los ligandos para NKG2D, MICA/B y ULBPs, en nuestra cohorte de pacientes no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos según riesgo de recaída. Torelli y colaboradores, en un estudio similar, analizaron la expresión de

los ligandos para NKG2D y DNAM1 en blastos de pacientes de LLA pediátricos y adultos, encontrando los mayores niveles de expresión de los ligandos ULBP1, ULBP3 y Nec-2 en aquellos pacientes que presentaban la translocación BCR-ABL, sobre todo cuando se comparaban con LLA sin alteraciones genéticas<sup>138</sup>. Diferentes estímulos que conllevan estrés y daño celular son los responsables de la regulación positiva de los ligandos para NKG2D en las células. En este sentido, la translocación BCR-ABL exhibida por las células de estos pacientes de LLA justificaría esta mayor expresión de los ligandos sin que ello represente probablemente ya una ventaja relevante para el individuo puesto que, otros aspectos intrínsecos a la célula, van a favorecer la progresión tumoral.

En paralelo al análisis de los niveles de expresión de los diferentes ligandos, estudiamos el patrón de expresión de los receptores de las células NK que infiltran la médula ósea de los pacientes, observando que las células de aquellos pacientes incluidos en el grupo de riesgo alto reducían la expresión de los receptores de activación NKp30 y NKp46, a la vez que incrementaban la de los receptores inhibidores NKG2A y KIR2DL2L3. Asimismo, observamos que dichas alteraciones se incrementaron en el caso de los pacientes que habían recaído en la enfermedad, con independencia del grupo de riesgo al que fuesen asignados en el momento del diagnóstico. Dichos resultados, junto con la ausencia del ligando B7H6 en las células leucémicas de dichos pacientes, sugieren una capacidad reducida de actuación de las células NK en este contexto que conllevaría una menor eliminación de las células tumorales, y en consonancia una evolución de la enfermedad menos favorable. Otro cambio que apoyaría esta menor capacidad funcional de las células NK de pacientes con un peor pronóstico es la reducida expresión del receptor BMPRIA, ya que como ha sido descrito por nuestro grupo, la vía de señalización BMP2/4 es fundamental en la adquisición de las capacidades funcionales de las células NK. Otros autores han descrito también la inhibición de la capacidad funcional de las células NK, por reducción de los receptores de activación en pacientes con leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda y síndrome mielodisplásico, confirmando además su relación con la evolución de la enfermedad<sup>165-168</sup>.

La implicación directa de las células leucémicas en estos cambios observados en la expresión de los receptores responsables de la funcionalidad de las células NK se pone de manifiesto en los estudios de cocultivos célula NK: célula leucémica. Nuestros resultados muestran cómo en presencia de las células leucémicas, las células NK reducen la expresión

de receptores de activación e incrementan la de receptores de inhibición, de manera dependiente al tiempo de cultivo y al número de células presentes en él. Sin embargo, observamos que estos cambios afectaban sobre todo a aquellas células que habían estado cultivadas con la línea de bajo riesgo NALM6, en comparación a las que se cultivaron en presencia de TOM1. Asimismo, la presencia de las células leucémicas redujo la expresión del receptor BMPRIA en la superficie de las células NK, confirmando los resultados observados en el análisis de las muestras de pacientes. Dichas alteraciones se tradujeron en una menor capacidad citotóxica y una reducción en la producción de IFN $\gamma$ , confirmando la reducción en su capacidad efectora.

Aunque son necesarios nuevos estudios que confirmen las diferencias observadas en las células NK de los pacientes, así como que permitan conocer los mecanismos que median en la interacción entre estas células y las células leucémicas, los resultados de este trabajo sugieren un papel muy importante del microambiente medular en el desarrollo de esta enfermedad, mediado por la producción de BMP4 por parte de las MSCs del estroma. Dicho BMP4 induciría una reducción en la proliferación de las células leucémicas, especialmente en aquellas cuyas alteraciones indican un mejor pronóstico, a la vez que incrementaría su susceptibilidad a la lisis mediada por las células NK. Sin embargo, la interacción que se establece dentro del nicho entre las células leucémicas y las células NK que lo infiltran supone la reducción de la funcionalidad de estas últimas, alterando el balance entre las señales protumorales y antitumorales del medio en favor de las primeras y permitiendo el desarrollo y avance de la enfermedad.

Asimismo, las diferencias encontradas entre los pacientes que recaen en la enfermedad y los que no recaen en lo que respecta a la expresión de ligandos para las células NK sugieren la importancia de incluir nuevos factores pronósticos que determinen el tratamiento más adecuado para los pacientes.





## **CONCLUSIONES**



A partir de los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir:

1. Las células madre mesenquimales aisladas de la médula ósea de pacientes de leucemia linfoblástica aguda con riesgo bajo/intermedio de recaída promueven la actividad citotóxica de las células NK estimulando su acción antitumoral. Por el contrario, las células aisladas de los pacientes con elevado riesgo de recaída presentan un comportamiento inmunosupresor similar al de las células de donantes sanos.
2. Los mecanismos responsables del cambio en el comportamiento inmunomodulador de las MSCs de los pacientes de LLA de bajo/intermedio riesgo incluyen secreción diferencial de factores solubles como TGF- $\beta$  y PGE2 y cambios en la expresión de TLRs y moléculas coestimuladoras (CD40, CD86) e inhibidoras (PDL-1, PDL-2).
3. Los estudios longitudinales indican que estas propiedades inmunoestimuladoras de las MSC-LLA se atenúan progresivamente en correlación con una médula ósea libre de leucemia.
4. Las MSC de donantes sanos adoptan características inmunomoduladoras propias de las MSCs de los pacientes de ALL cuando son expuestas a células leucémicas.
5. Las MSCs aisladas de los pacientes en el momento del diagnóstico producen niveles incrementados de BMP4, ligando que es responsable, junto con otros factores, de los cambios observados en la función inmunomoduladora.
6. La estimulación de la vía de señalización BMP reduce la capacidad proliferativa, sin alterar la viabilidad, de células leucémicas catalogadas de riesgo bajo de recaída. Asimismo, incrementa la susceptibilidad de dichas células a la lisis mediada por las células NK al aumentar los niveles de expresión de los ligandos MICB, ULBP3 y B7H6 para receptores de activación.

7. Como consecuencia directa de la presencia de las células leucémicas, las células NK presentes en la médula ósea de pacientes de LLA de riesgo alto o que han recaído, presentan un patrón de expresión de receptores activadores e inhibidores que sugieren una menor funcionalidad de las mismas respecto al patrón exhibido por células NK de pacientes de bajo/intermedio riesgo. Concretamente, los bajos niveles de expresión del receptor activador NKp30 en las células NK de la médula ósea, junto con los niveles reducidos de su ligando B7H6 en las células leucémicas de estos pacientes, podrían ser relevantes para la evolución de la enfermedad.
8. La señalización BMP autocrina, a través de BMPRIA, sería responsable de la funcionalidad de las células NK en la enfermedad.

## **BIBLIOGRAFÍA**



1. RNTI-SEHOP *Informe Estadístico Registro Nacional de Tumores Infantiles - Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica*.(1980-2013).
2. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. *Acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet 381:1943-1955, (2013).
3. Mullighan CG. *Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Semin Hematol 50:314-324, (2013).
4. Hunger SP, Mullighan CG. *Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine*. Blood 125:3977-3987, (2015).
5. Taylor KH, Briley A, Wang Z, Cheng J, Shi H, Caldwell CW. *Aberrant epigenetic gene regulation in lymphoid malignancies*. Semin Hematol 50:38-47, (2013).
6. Pui CH, Behm FG, Crist WM. *Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood 82:343-362, (1993).
7. Ghazavi F, Lammens T, Van Roy N, Poppe B, Speleman F, Benoit Y, Van Vlierberghe P, De Moerloose B. *Molecular basis and clinical significance of genetic aberrations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia*. Exp Hematol, (2015).
8. Ortega JJ, Ribera JM, Oriol A, Bastida P, Gonzalez ME, Calvo C, Egurbide I, Hernandez Rivas JM, Rivas C, Alcalá A, Besalduch J, Macia J, et al. *Early and delayed consolidation chemotherapy significantly improves the outcome of children with intermediate risk acute lymphoblastic leukemia. Final results of the prospective randomized PETHEMA ALL-89 TRIAL*. Haematologica 86:586-595, (2001).
9. Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, Stow P, Su X, Shurtleff S, Pui CH, Downing JR, Campana D. *New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia*. Blood 117:6267-6276, (2011).
10. Bhojwani D, Pui CH. *Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet Oncol 14:e205-217, (2013).
11. Raimondi SC, Pui CH, Head DR, Rivera GK, Behm FG. *Cytogenetically different leukemic clones at relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood 82:576-580, (1993).
12. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, Downing JR. *Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia*. Science 322:1377-1380, (2008).
13. Pui CH. *Genomic and pharmacogenetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia*. Front Med 9:1-9, (2015).
14. Nguyen K, Devidas M, Cheng SC, La M, Raetz EA, Carroll WL, Winick NJ, Hunger SP, Gaynon PS, Loh ML. *Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study*. Leukemia 22:2142-2150, (2008).
15. Pulsipher MA, Peters C, Pui CH. *High-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia: to transplant or not to transplant?* Biol Blood Marrow Transplant 17:S137-148, (2010).
16. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, Vora A, Baruchel A, Silverman LB, Schmiegelow K, Escherich G, Horibe K, et al. *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration*. J Clin Oncol 33:2938-2948, (2015).
17. Park JH, Sauter C, Brentjens R. *Cellular therapies in acute lymphoblastic leukemia*. Hematol Oncol Clin North Am 25:1281-1301, (2011).
18. Batlevi CL, Matsuki E, Brentjens RJ, Younes A. *Novel immunotherapies in lymphoid malignancies*. Nat Rev Clin Oncol 13:25-40, (2015).



19. Fan D, Li W, Yang Y, Zhang X, Zhang Q, Yan Y, Yang M, Wang J, Xiong D. *Redirection of CD4+ and CD8+ T lymphocytes via an anti-CD3 x anti-CD19 bi-specific antibody combined with cytosine arabinoside and the efficient lysis of patient-derived B-ALL cells.* J Hematol Oncol 8:108, **(2015)**.
20. Ruggeri L, Parisi S, Urbani E, Curti A. *Alloreactive Natural Killer Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: From Stem Cell Transplantation to Adoptive Immunotherapy.* Front Immunol 6:479, **(2015)**.
21. Epner E, Saroya BS, Hasanali Z, Loughran T. *Combination Epigenetic and Immunotherapy Overcomes Resistance to Monoclonal Antibodies in Hematologic Malignancies- A New Therapeutic Approach.* Exp Hematol, **(2016)**.
22. Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, Fabb SA, Swann J, McArthur GA, Westmoreland SV, Chambon P, Scadden DT, Purton LE. *A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency.* Cell 129:1097-1110, **(2007)**.
23. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al-Shahrour F, Hasserjian RP, Scadden EO, Aung Z, Matza M, et al. *Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia.* Nature 464:852-857, **(2010)**.
24. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Rathinam CV, Luo N, Khiabani H, Lee A, Murty VV, Friedman R, Brum A, Park D, et al. *Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts.* Nature 506:240-244, **(2014)**.
25. Arranz L, Sanchez-Aguilera A, Martin-Perez D, Isern J, Langa X, Tzankov A, Lundberg P, Muntion S, Tzeng YS, Lai DM, Schwaller J, Skoda RC, et al. *Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms.* Nature 512:78-81, **(2014)**.
26. Medyouf H, Mossner M, Jann JC, Nolte F, Raffel S, Herrmann C, Lier A, Eisen C, Nowak V, Zens B, Mudder K, Klein C, et al. *Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit.* Cell Stem Cell 14:824-837, **(2014)**.
27. Kim JA, Shim JS, Lee GY, Yim HW, Kim TM, Kim M, Leem SH, Lee JW, Min CK, Oh IH. *Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia.* Cancer Res 75:2222-2231, **(2015)**.
28. Lee GY, Kim JA, Oh IH. *Stem cell niche as a prognostic factor in leukemia.* BMB Rep 48:427-428, **(2015)**.
29. Schofield R. *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell.* Blood Cells 4:7-25, **(1978)**.
30. Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J, Cote D, Rowe DW, Lin CP, Scadden DT. *Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche.* Nature 457:92-96, **(2009)**.
31. Khorshed RA, Hawkins ED, Duarte D, Scott MK, Akinduro OA, Rashidi NM, Spitaler M, Lo Celso C. *Automated Identification and Localization of Hematopoietic Stem Cells in 3D Intravital Microscopy Data.* Stem Cell Reports 5:139-153, **(2015)**.
32. Boulais PE, Frenette PS. *Making sense of hematopoietic stem cell niches.* Blood 125:2621-2629, **(2015)**.
33. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche.* Cell 118:149-161, **(2004)**.

34. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, et al. *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature 425:841-846, (2003).
35. Wang W, Yu S, Zimmerman G, Wang Y, Myers J, Yu VW, Huang D, Huang X, Shim J, Huang Y, Xin W, Qiao P, et al. *Notch Receptor-Ligand Engagement Maintains Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Niche Retention*. Stem Cells 33:2280-2293, (2015).
36. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, et al. *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature 425:836-841, (2003).
37. Sugimura R, He XC, Venkatraman A, Arai F, Box A, Semerad C, Haug JS, Peng L, Zhong XB, Suda T, Li L. *Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche*. Cell 150:351-365, (2012).
38. Ding L, Morrison SJ. *Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches*. Nature 495:231-235, (2013).
39. Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettpeiz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, Nagasawa T, Link DC. *CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance*. Nature 495:227-230, (2013).
40. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi BI, Nagasawa T. *Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development*. Immunity 20:707-718, (2004).
41. Wilson NK, Kent DG, Buettner F, Shehata M, Macaulay IC, Calero-Nieto FJ, Sanchez Castillo M, Oedekoven CA, Diamanti E, Schulte R, Ponting CP, Voet T, et al. *Combined Single-Cell Functional and Gene Expression Analysis Resolves Heterogeneity within Stem Cell Populations*. Cell Stem Cell 16:712-724, (2015).
42. Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature 466:829-834, (2010).
43. Owen M, Friedenstien AJ. *Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors*. Ciba Found Symp 136:42-60, (1988).
44. Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. *Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment*. Blood 107:1878-1887, (2006).
45. Caplan AI. *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res 9:641-650, (1991).
46. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, et al. *Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors*. Anat Rec 264:51-62, (2001).
47. Erices A, Conget P, Minguell JJ. *Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood*. Br J Haematol 109:235-242, (2000).
48. Wang S, Mundada L, Johnson S, Wong J, Witt R, Ohye RG, Si MS. *Characterization and angiogenic potential of human neonatal and infant thymus mesenchymal stromal cells*. Stem Cells Transl Med 4:339-350, (2015).
49. Kusuma GD, Menicanin D, Gronthos S, Manuelpillai U, Abumaree MH, Pertile MD, Brennecke SP, Kalionis B. *Ectopic Bone Formation by Mesenchymal Stem Cells*

- Derived from Human Term Placenta and the Decidua*. PLoS One 10:e0141246, (2015).
50. Heidari B, Shirazi A, Akhondi MM, Hassanpour H, Behzadi B, Naderi MM, Sarvari A, Borjian S. *Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue*. Avicenna J Med Biotechnol 5:104-117, (2013).
  51. Lojewski X, Srimasorn S, Rauh J, Francke S, Wobus M, Taylor V, Arauzo-Bravo MJ, Hallmeyer-Elgner S, Kirsch M, Schwarz S, Schwarz J, Storch A, et al. *Perivascular Mesenchymal Stem Cells From the Adult Human Brain Harbor No Intrinsic Neuroectodermal but High Mesodermal Differentiation Potential*. Stem Cells Transl Med 4:1223-1233, (2015).
  52. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. Stem Cells 24:1294-1301, (2006).
  53. Trivanovic D, Jaukovic A, Popovic B, Krstic J, Mojsilovic S, Okic-Djordjevic I, Kukolj T, Obradovic H, Santibanez JF, Bugarski D. *Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression*. Life Sci 141:61-73, (2015).
  54. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy 8:315-317, (2006).
  55. Siegel G, Kluba T, Hermanutz-Klein U, Bieback K, Northoff H, Schafer R. *Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*. BMC Med 11:146, (2013).
  56. Anbari F, Khalili MA, Bahrami AR, Khoradmehr A, Sadeghian F, Fesahat F, Nabi A. *Intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells promotes neural regeneration after traumatic brain injury*. Neural Regen Res 9:919-923, (2014).
  57. Lu W, Xiu X, Zhao Y, Gui M. *Improved Proliferation and Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Into Vascular Endothelial Cells With Sphingosine 1-Phosphate*. Transplant Proc 47:2035-2040, (2015).
  58. Zheng G, Liu Y, Jing Q, Zhang L. *Differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes in vitro*. Biomed Mater Eng 25:145-157, (2015).
  59. Shen H, Wang Y, Zhang Z, Yang J, Hu S, Shen Z. *Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Regenerative Therapy: Optimization of Cell Differentiation Strategy*. Stem Cells Int 2015:524756, (2015).
  60. Aggarwal S, Pittenger MF. *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood 105:1815-1822, (2005).
  61. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. Blood 99:3838-3843, (2002).
  62. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. *Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway*. Eur J Immunol 35:1482-1490, (2005).

63. Del Papa B, Sportoletti P, Cecchini D, Rosati E, Balucani C, Baldoni S, Fettucciari K, Marconi P, Martelli MF, Falzetti F, Di Ianni M. *Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction*. Eur J Immunol 43:182-187, **(2013)**.
64. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, Mazzinghi B, Maggi L, Pasini A, Lisi V, Santarlasci V, Consoloni L, et al. *Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling*. Stem Cells 26:279-289, **(2008)**.
65. Chinnadurai R, Copland IB, Patel SR, Galipeau J. *IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN-gamma-licensed human mesenchymal stromal cells*. J Immunol 192:1491-1501, **(2014)**.
66. Dorronsoro A, Ferrin I, Salcedo JM, Jakobsson E, Fernandez-Rueda J, Lang V, Sepulveda P, Fechter K, Pennington D, Trigueros C. *Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell responses through TNF-alpha-mediated activation of NF-kappaB*. Eur J Immunol 44:480-488, **(2014)**.
67. Cuerquis J, Romieu-Mourez R, Francois M, Routy JP, Young YK, Zhao J, Eliopoulos N. *Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha stimulation*. Cytotherapy 16:191-202, **(2014)**.
68. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. *Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways*. Stem Cell Res Ther 2:34, **(2011)**.
69. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. *Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype*. Haematologica 90:516-525, **(2005)**.
70. Laranjeira P, Pedrosa M, Pedreiro S, Gomes J, Martinho A, Antunes B, Ribeiro T, Santos F, Trindade H, Paiva A. *Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive, memory, and effector T cells*. Stem Cell Res Ther 6:3, **(2015)**.
71. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. *Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction*. Haematologica 92:881-888, **(2007)**.
72. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. *Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells*. Blood 105:4120-4126, **(2005)**.
73. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. *Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells*. J Immunol 177:2080-2087, **(2006)**.
74. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. *Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle*. Transplantation 83:71-76, **(2007)**.
75. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. *MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2*. Blood 113:6576-6583, **(2009)**.
76. Kim J, Hematti P. *Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages*. Exp Hematol 37:1445-1453, **(2009)**.

77. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, et al. *Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production*. Nat Med 15:42-49, **(2009)**.
78. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. *Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions*. Blood 107:367-372, **(2006)**.
79. Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, Kalionis B. *Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells*. Stem Cell Rev 8:375-392, **(2011)**.
80. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. *A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype*. PLoS One 5:e10088, **(2010)**.
81. Betancourt AM. *New Cell-Based Therapy Paradigm: Induction of Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells into Pro-Inflammatory MSC1 and Anti-inflammatory MSC2 Phenotypes*. Adv Biochem Eng Biotechnol 130:163-197, **(2012)**.
82. Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM. *Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis*. PLoS One 7:e45590, **(2012)**.
83. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells*. Lancet 363:1439-1441, **(2004)**.
84. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, et al. *Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study*. Lancet 371:1579-1586, **(2008)**.
85. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, Minelli A, Alvisi C, Vanoli A, Calliada F, Dionigi P, Perotti C, et al. *Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease*. Gut 60:788-798, **(2011)**.
86. Wang D, Zhang H, Liang J, Li X, Feng X, Wang H, Hua B, Liu B, Lu L, Gilkeson GS, Silver RM, Chen W, et al. *Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience*. Cell Transplant 22:2267-2277, **(2013)**.
87. Karussis D, Grigoriadis S, Polyzoidou E, Grigoriadis N, Slavin S, Abramsky O. *Neuroprotection in multiple sclerosis*. Clin Neurol Neurosurg 108:250-254, **(2006)**.
88. Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, Huguet M, Sentis J, Sanchez A, Garcia-Sancho J. *Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study*. Transplantation 95:1535-1541, **(2013)**.
89. Gotherstrom C, Westgren M, Shaw SW, Astrom E, Biswas A, Byers PH, Mattar CN, Graham GE, Taslimi J, Ewald U, Fisk NM, Yeoh AE, et al. *Pre- and postnatal transplantation of fetal mesenchymal stem cells in osteogenesis imperfecta: a two-center experience*. Stem Cells Transl Med 3:255-264, **(2014)**.
90. Tan J, Wu W, Xu X, Liao L, Zheng F, Messinger S, Sun X, Chen J, Yang S, Cai J, Gao X, Pileggi A, et al. *Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial*. JAMA 307:1169-1177, **(2012)**.

91. Mathiasen AB, Haack-Sorensen M, Kastrup J. *Mesenchymal stromal cells for cardiovascular repair: current status and future challenges*. *Future Cardiol* 5:605-617, **(2009)**.
92. Garcia-Castro J, Alemany R, Cascallo M, Martinez-Quintanilla J, Arriero Mdel M, Lassaletta A, Madero L, Ramirez M. *Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study*. *Cancer Gene Ther* 17:476-483, **(2010)**.
93. Jing W, Chen Y, Lu L, Hu X, Shao C, Zhang Y, Zhou X, Zhou Y, Wu L, Liu R, Fan K, Jin G. *Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells producing IL15 eradicate established pancreatic tumor in syngeneic mice*. *Mol Cancer Ther* 13:2127-2137, **(2014)**.
94. Bonomi A, Silini A, Vertua E, Signoroni PB, Cocce V, Cavicchini L, Sisto F, Alessandri G, Pessina A, Parolini O. *Human amniotic mesenchymal stromal cells (hAMSCs) as potential vehicles for drug delivery in cancer therapy: an in vitro study*. *Stem Cell Res Ther* 6:155, **(2015)**.
95. Schepers K, Pietras EM, Reynaud D, Flach J, Binnewies M, Garg T, Wagers AJ, Hsiao EC, Passegue E. *Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche*. *Cell Stem Cell* 13:285-299, **(2013)**.
96. Menendez P, Catalina P, Rodriguez R, Melen GJ, Bueno C, Arriero M, Garcia-Sanchez F, Lassaletta A, Garcia-Sanz R, Garcia-Castro J. *Bone marrow mesenchymal stem cells from infants with MLL-AF4+ acute leukemia harbor and express the MLL-AF4 fusion gene*. *J Exp Med* 206:3131-3141, **(2009)**.
97. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, Ternaux B, Lacassagne MN, Crinquette A, Dessoly J, Sciaini AK, Benbunan M, Chomienne C, Fermand JP, Marolleau JP, et al. *Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma*. *Leukemia* 21:158-163, **(2007)**.
98. Garderet L, Mazurier C, Chapel A, Ernou I, Boutin L, Holy X, Gorin NC, Lopez M, Doucet C, Lataillade JJ. *Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma*. *Leuk Lymphoma* 48:2032-2041, **(2007)**.
99. Xishan Z, Guangyu A, Yuguang S, Hongmei Z. *The research on the immunomodulatory defect of mesenchymal stem cell from Chronic Myeloid Leukemia patients*. *J Exp Clin Cancer Res* 30:47, **(2011)**.
100. Geyh S, Oz S, Cadeddu RP, Frobel J, Bruckner B, Kundgen A, Fenk R, Bruns I, Zilkens C, Hermsen D, Gattermann N, Kobbe G, et al. *Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells*. *Leukemia* 27:1841-1851, **(2013)**.
101. Conforti A, Biagini S, Del Bufalo F, Sirleto P, Angioni A, Starc N, Li Pira G, Moretta F, Proia A, Contoli B, Genovese S, Ciardi C, et al. *Biological, functional and genetic characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from pediatric patients affected by acute lymphoblastic leukemia*. *PLoS One* 8:e76989, **(2013)**.
102. Civini S, Jin P, Ren J, Sabatino M, Castiello L, Jin J, Wang H, Zhao Y, Marincola F, Stroncek D. *Leukemia cells induce changes in human bone marrow stromal cells*. *J Transl Med* 11:298, **(2013)**.
103. Pavlaki K, Pontikoglou CG, Demetriadou A, Batsali AK, Damianaki A, Simantirakis E, Kontakis M, Galanopoulos A, Kotsianidis I, Kastrinaki MC, Papadaki HA. *Impaired proliferative potential of bone marrow mesenchymal stromal cells in patients with myelodysplastic syndromes is associated with abnormal WNT signaling pathway*. *Stem Cells Dev* 23:1568-1581, **(2014)**.



104. Fei C, Zhao Y, Gu S, Guo J, Zhang X, Li X, Chang C. *Impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with lower-risk myelodysplastic syndromes*. Tumour Biol 35:4307-4316, (2014).
105. Binato R, de Almeida Oliveira NC, Du Rocher B, Abdelhay E. *The molecular signature of AML mesenchymal stromal cells reveals candidate genes related to the leukemogenic process*. Cancer Lett 369:134-143, (2015).
106. Zhao Y, Wu D, Fei C, Guo J, Gu S, Zhu Y, Xu F, Zhang Z, Wu L, Li X, Chang C. *Down-regulation of Dicer1 promotes cellular senescence and decreases the differentiation and stem cell-supporting capacities of mesenchymal stromal cells in patients with myelodysplastic syndrome*. Haematologica 100:194-204, (2015).
107. Chandran P, Le Y, Li Y, Sabloff M, Mehic J, Rosu-Myles M, Allan DS. *Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors*. Leuk Res 39:486-493, (2015).
108. Calkoen FG, Vervat C, van Pel M, de Haas V, Vijfhuizen LS, Eising E, Kroes WG, t Hoen PA, van den Heuvel-Eibrink MM, Egeler RM, van Tol MJ, Ball LM. *Despite differential gene expression profiles pediatric MDS derived mesenchymal stromal cells display functionality in vitro*. Stem Cell Res 14:198-210, (2015).
109. Andre T, Najar M, Stamatopoulos B, Pieters K, Pradier O, Bron D, Meuleman N, Lagneaux L. *Immune impairments in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells*. Cancer Immunol Immunother 64:213-224, (2015).
110. Cogle CR, Saki N, Khodadi E, Li J, Shahjehani M, Azizidoost S. *Bone marrow niche in the myelodysplastic syndromes*. Leuk Res 39:1020-1027, (2015).
111. Wang Z, Tang X, Xu W, Cao Z, Sun L, Li W, Li Q, Zou P, Zhao Z. *The different immunoregulatory functions on dendritic cells between mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with low-risk or high-risk myelodysplastic syndromes*. PLoS One 8:e57470, (2013).
112. Rosenberg EB, McCoy JL, Green SS, Donnelly FC, Siwarski DF, Levine PH, Herberman RB. *Destruction of human lymphoid tissue-culture cell lines by human peripheral lymphocytes in 51Cr-release cellular cytotoxicity assays*. J Natl Cancer Inst 52:345-352, (1974).
113. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. *Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells*. Int J Cancer 16:230-239, (1975).
114. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. *Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity*. Int J Cancer 16:216-229, (1975).
115. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE, Powrie F, Vivier E. *Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature*. Nat Rev Immunol 13:145-149, (2013).
116. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. *NK cells at the interface between innate and adaptive immunity*. Cell Death Differ 15:226-233, (2008).
117. Carrega P, Ferlazzo G. *Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues*. Front Immunol 3:347, (2012).
118. Morandi F, Horenstein AL, Chillemi A, Quarona V, Chiesa S, Imperatori A, Zanellato S, Mortara L, Gattorno M, Pistoia V, Malavasi F. *CD56brightCD16- NK Cells Produce Adenosine through a CD38-Mediated Pathway and Act as Regulatory Cells Inhibiting Autologous CD4+ T Cell Proliferation*. J Immunol 195:965-972, (2015).

119. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science 331:44-49, **(2011)**.
120. Beaulieu AM, Madera S, Sun JC. *Molecular Programming of Immunological Memory in Natural Killer Cells*. Adv Exp Med Biol 850:81-91, **(2015)**.
121. Walzer T, Jaeger S, Chaix J, Vivier E. *Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses*. Curr Opin Immunol 19:365-372, **(2007)**.
122. Caligiuri MA. *Human natural killer cells*. Blood 112:461-469, **(2008)**.
123. Lima M, Teixeira MA, Queiros ML, Leite M, Santos AH, Justica B, Orfao A. *Immunophenotypic characterization of normal blood CD56+lo versus CD56+hi NK-cell subsets and its impact on the understanding of their tissue distribution and functional properties*. Blood Cells Mol Dis 27:731-743, **(2001)**.
124. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol 22:633-640, **(2001)**.
125. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol 9:503-510, **(2008)**.
126. Carrega P, Bonaccorsi I, Di Carlo E, Morandi B, Paul P, Rizzello V, Cipollone G, Navarra G, Mingari MC, Moretta L, Ferlazzo G. *CD56(bright)perforin(low) noncytotoxic human NK cells are abundant in both healthy and neoplastic solid tissues and recirculate to secondary lymphoid organs via afferent lymph*. J Immunol 192:3805-3815, **(2014)**.
127. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaeheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset*. Blood 97:3146-3151, **(2001)**.
128. De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. *Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation*. Proc Natl Acad Sci U S A 108:728-732, **(2011)**.
129. Nielsen N, Odum N, Urso B, Lanier LL, Spee P. *Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A*. PLoS One 7:e31959, **(2012)**.
130. Bellora F, Castriconi R, Dondero A, Carrega P, Mantovani A, Ferlazzo G, Moretta A, Bottino C. *Human NK cells and NK receptors*. Immunol Lett 161:168-173, **(2014)**.
131. Freud AG, Yu J, Caligiuri MA. *Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues*. Semin Immunol 26:132-137, **(2014)**.
132. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules*. Nature 436:709-713, **(2005)**.
133. Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetyncck S, Stewart CA, Bresó V, Frassati C, Revirón D, Middleton D, Romagne F, Ugolini S, et al. *Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I*. Immunity 25:331-342, **(2006)**.
134. Vilches C, Parham P. *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity*. Annu Rev Immunol 20:217-251, **(2002)**.
135. Vivier E, Nunes JA, Vely F. *Natural killer cell signaling pathways*. Science 306:1517-1519, **(2004)**.
136. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells*. Immunol Rev 214:73-91, **(2006)**.



137. Kasahara M, Yoshida S. *Immunogenetics of the NKG2D ligand gene family*. Immunogenetics 64:855-867, **(2012)**.
138. Torelli GF, Peragine N, Raponi S, Pagliara D, De Propriis MS, Vitale A, Bertaina A, Barberi W, Moretta L, Basso G, Santoni A, Guarini A, et al. *Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells*. Haematologica 99:1248-1254, **(2014)**.
139. Tsukagoshi M, Wada S, Yokobori T, Altan B, Ishii N, Watanabe A, Kubo N, Saito F, Araki K, Suzuki H, Hosouchi Y, Kuwano H. *Overexpression of natural killer group 2 member D ligands predicts favorable prognosis in cholangiocarcinoma*. Cancer Sci 107:116-122, **(2015)**.
140. Ribeiro CH, Kramm K, Galvez-Jiron F, Pola V, Bustamante M, Contreras HR, Sabag A, Garrido-Tapia M, Hernandez CJ, Zuniga R, Collazo N, Sotelo PH, et al. *Clinical significance of tumor expression of major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MICA/B) in gastric cancer patients*. Oncol Rep 35:1309-1317, **(2015)**.
141. Schlegel P, Ditthard K, Lang P, Mezger M, Michaelis S, Handgretinger R, Pfeiffer M. *NKG2D Signaling Leads to NK Cell Mediated Lysis of Childhood AML*. J Immunol Res 2015:473175, **(2015)**.
142. Li Y, Wang Q, Mariuzza RA. *Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6*. J Exp Med 208:703-714, **(2011)**.
143. Kaifu T, Escaliere B, Gastinel LN, Vivier E, Baratin M. *B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors*. Cell Mol Life Sci 68:3531-3539, **(2011)**.
144. Zhou Y, Xu Y, Chen L, Xu B, Wu C, Jiang J. *B7-H6 expression correlates with cancer progression and patient's survival in human ovarian cancer*. Int J Clin Exp Pathol 8:9428-9433, **(2015)**.
145. Varbanova V, Naumova E, Mihaylova A. *Killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and ligands and their role in hematologic malignancies*. Cancer Immunol Immunother, **(2016)**.
146. Vitale M, Falco M, Castriconi R, Parolini S, Zambello R, Semenzato G, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. *Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells*. Eur J Immunol 31:233-242, **(2001)**.
147. Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Onoda Y, Zhang H, Yamazaki S, Miyamoto A, Honda S, Lanier LL, Shibuya A. *Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112)*. Int Immunol 16:533-538, **(2004)**.
148. Mathew SO, Rao KK, Kim JR, Bambard ND, Mathew PA. *Functional role of human NK cell receptor 2B4 (CD244) isoforms*. Eur J Immunol 39:1632-1641, **(2009)**.
149. Adrain C, Murphy BM, Martin SJ. *Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B*. J Biol Chem 280:4663-4673, **(2005)**.
150. Praper T, Sonnen AF, Kladnik A, Andrichetti AO, Viero G, Morris KJ, Volpi E, Lunelli L, Dalla Serra M, Froelich CJ, Gilbert RJ, Anderluh G. *Perforin activity at membranes leads to invaginations and vesicle formation*. Proc Natl Acad Sci U S A 108:21016-21021, **(2011)**.

151. Mace EM, Dongre P, Hsu HT, Sinha P, James AM, Mann SS, Forbes LR, Watkin LB, Orange JS. *Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity*. Immunol Cell Biol 92:245-255, **(2014)**.
152. Mandelboim O, Malik P, Davis DM, Jo CH, Boyson JE, Strominger JL. *Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A 96:5640-5644, **(1999)**.
153. Chavez-Galan L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chavez R, Lascurain R. *Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes*. Cell Mol Immunol 6:15-25, **(2009)**.
154. Falschlehner C, Schaefer U, Walczak H. *Following TRAIL's path in the immune system*. Immunology 127:145-154, **(2009)**.
155. Bonavida B. *NK cell phenotypic and functional heterogeneities and molecular mechanisms of cytotoxicity*. Crit Rev Oncog 19:21-45, **(2014)**.
156. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"*. Blood 106:2252-2258, **(2005)**.
157. Stojanovic A, Correia MP, Cerwenka A. *Shaping of NK cell responses by the tumor microenvironment*. Cancer Microenviron 6:135-146, **(2013)**.
158. Benson DM, Jr., Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, Baiocchi RA, Zhang J, Yu J, Smith MK, Greenfield CN, Porcu P, et al. *The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody*. Blood 116:2286-2294, **(2010)**.
159. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. *Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function*. Eur J Immunol 44:1582-1592, **(2014)**.
160. Pietra G, Vitale M, Moretta L, Mingari MC. *How melanoma cells inactivate NK cells*. Oncoimmunology 1:974-975, **(2012)**.
161. Castriconi R, Dondero A, Bellora F, Moretta L, Castellano A, Locatelli F, Corrias MV, Moretta A, Bottino C. *Neuroblastoma-derived TGF-beta1 modulates the chemokine receptor repertoire of human resting NK cells*. J Immunol 190:5321-5328, **(2013)**.
162. Jin S, Deng Y, Hao JW, Li Y, Liu B, Yu Y, Shi FD, Zhou QH. *NK cell phenotypic modulation in lung cancer environment*. PLoS One 9:e109976, **(2014)**.
163. Pasero C, Gravis G, Granjeaud S, Guerin M, Thomassin-Piana J, Rocchi P, Salem N, Walz J, Moretta A, Olive D. *Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer*. Oncotarget 6:14360-14373, **(2015)**.
164. Mamessier E, Sylvain A, Thibault ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Goncalves A, Andre P, Romagne F, Thibault G, Viens P, Birnbaum D, et al. *Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity*. J Clin Invest 121:3609-3622, **(2011)**.
165. Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, Rollison DE, Salih HR, Krusch M, Zou J, Ku E, Zhong B, Boulware D, Moscinski L, Wei S, et al. *Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors*. Blood 109:4816-4824, **(2007)**.
166. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty D, Olive D, Costello RT. *Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction*. Blood 109:323-330, **(2007)**.
167. Khaznadar Z, Boissel N, Agaue S, Henry G, Cheok M, Vignon M, Geromin D, Cayuela JM, Castaigne S, Pautas C, Raffoux E, Lachuer J, et al. *Defective NK Cells in*

- Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis Are Associated with Blast Transcriptional Signatures of Immune Evasion.* J Immunol 195:2580-2590, **(2015)**.
168. Costello RT, Knoblauch B, Sanchez C, Mercier D, Le Treut T, Sebahoun G. *Expression of natural killer cell activating receptors in patients with chronic lymphocytic leukaemia.* Immunology 135:151-157, **(2012)**.
  169. Ashiru O, Boutet P, Fernandez-Messina L, Aguera-Gonzalez S, Skepper JN, Vales-Gomez M, Reyburn HT. *Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA\*008 that is shed by tumor cells in exosomes.* Cancer Res 70:481-489, **(2010)**.
  170. Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grunebach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T, Steinle A, Salih HR. *Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses.* J Immunol 189:1360-1371, **(2012)**.
  171. Lundholm M, Schroder M, Nagaeva O, Baranov V, Widmark A, Mincheva-Nilsson L, Wikstrom P. *Prostate tumor-derived exosomes down-regulate NKG2D expression on natural killer cells and CD8+ T cells: mechanism of immune evasion.* PLoS One 9:e108925, **(2014)**.
  172. Labani-Motlagh A, Israelsson P, Ottander U, Lundin E, Nagaev I, Nagaeva O, Dehlin E, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. *Differential expression of ligands for NKG2D and DNAM-1 receptors by epithelial ovarian cancer-derived exosomes and its influence on NK cell cytotoxicity.* Tumour Biol, **(2015)**.
  173. Baragano Raneros A, Martin-Palanco V, Fernandez AF, Rodriguez RM, Fraga MF, Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B. *Methylation of NKG2D ligands contributes to immune system evasion in acute myeloid leukemia.* Genes Immun 16:71-82, **(2015)**.
  174. Feuchtinger T, Pfeiffer M, Pfaffle A, Teltschik HM, Wernet D, Schumm M, Lotfi R, Handgretinger R, Lang P. *Cytolytic activity of NK cell clones against acute childhood precursor-B-cell leukaemia is influenced by HLA class I expression on blasts and the differential KIR phenotype of NK clones.* Bone Marrow Transplant 43:875-881, **(2009)**.
  175. Locafaro G, Amodio G, Tomasoni D, Tresoldi C, Ciceri F, Gregori S. *HLA-G expression on blasts and tolerogenic cells in patients affected by acute myeloid leukemia.* J Immunol Res 2014:636292, **(2014)**.
  176. Shen M, Linn YC, Ren EC. *KIR-HLA profiling shows presence of higher frequencies of strong inhibitory KIR-ligands among prognostically poor risk AML patients.* Immunogenetics 68:133-144, **(2016)**.
  177. Pachynski RK, Zabel BA, Kohrt HE, Tejeda NM, Monnier J, Swanson CD, Holzer AK, Gentles AJ, Sperinde GV, Edalati A, Hadeiba HA, Alizadeh AA, et al. *The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses.* J Exp Med 209:1427-1435, **(2012)**.
  178. Krasnova Y, Putz EM, Smyth MJ, Souza-Fonseca-Guimaraes F. *Bench to bedside: NK cells and control of metastasis.* Clin Immunol, **(2015)**.
  179. Perez-Martinez A, Fernandez L, Valentin J, Martinez-Romera I, Corral MD, Ramirez M, Abad L, Santamaria S, Gonzalez-Vicent M, Sirvent S, Sevilla J, Vicario JL, et al. *A phase I/II trial of interleukin-15--stimulated natural killer cell infusion after haplo-identical stem cell transplantation for pediatric refractory solid tumors.* Cytotherapy 17:1594-1603, **(2015)**.

180. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. *Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells*. Stem Cells 24:74-85, **(2006)**.
181. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. *Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2*. Blood 111:1327-1333, **(2008)**.
182. Pradier A, Passweg J, Villard J, Kindler V. *Human bone marrow stromal cells and skin fibroblasts inhibit natural killer cell proliferation and cytotoxic activity*. Cell Transplant 20:681-691, **(2010)**.
183. Lu Y, Liu J, Liu Y, Qin Y, Luo Q, Wang Q, Duan H. *TLR4 plays a crucial role in MSC-induced inhibition of NK cell function*. Biochem Biophys Res Commun, **(2015)**.
184. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. *Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation*. Blood 107:1484-1490, **(2006)**.
185. Casado JG, Tarazona R, Sanchez-Margallo FM. *NK and MSCs crosstalk: the sense of immunomodulation and their sensitivity*. Stem Cell Rev 9:184-189, **(2013)**.
186. Li Y, Qu YH, Wu YF, Wang XP, Wei J, Huang WG, Zhou DH, Fang J, Huang K, Huang SL. *Bone marrow mesenchymal stem cells reduce the antitumor activity of cytokine-induced killer/natural killer cells in K562 NOD/SCID mice*. Ann Hematol 90:873-885, **(2011)**.
187. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. *Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression?* Trends Immunol 28:219-226, **(2007)**.
188. Urist MR. *Bone: formation by autoinduction*. Science 150:893-899, **(1965)**.
189. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities*. Science 242:1528-1534, **(1988)**.
190. Massague J, Chen YG. *Controlling TGF-beta signaling*. Genes Dev 14:627-644, **(2000)**.
191. Reddi AH. *BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins*. Cytokine Growth Factor Rev 16:249-250, **(2005)**.
192. Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. *Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications*. Arch Biochem Biophys 561:64-73, **(2014)**.
193. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. *Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction*. J Biochem 147:35-51, **(2010)**.
194. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. *Bone morphogenetic proteins: a critical review*. Cell Signal 23:609-620, **(2010)**.
195. Ramel MC, Hill CS. *Spatial regulation of BMP activity*. FEBS Lett 586:1929-1941, **(2012)**.
196. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, Wozney JM. *Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo*. Growth Factors 13:291-300, **(1996)**.
197. Valera E, Isaacs MJ, Kawakami Y, Izpisua Belmonte JC, Choe S. *BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells*. PLoS One 5:e11167, **(2010)**.

198. Neugebauer JM, Kwon S, Kim HS, Donley N, Tilak A, Sopory S, Christian JL. *The prodomain of BMP4 is necessary and sufficient to generate stable BMP4/7 heterodimers with enhanced bioactivity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A 112:E2307-2316, **(2015)**.
199. Morimoto T, Kaito T, Matsuo Y, Sugiura T, Kashii M, Makino T, Iwasaki M, Yoshikawa H. *The bone morphogenetic protein-2/7 heterodimer is a stronger inducer of bone regeneration than the individual homodimers in a rat spinal fusion model*. Spine J 15:1379-1390, **(2015)**.
200. Derynck R, Zhang YE. *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature 425:577-584, **(2003)**.
201. ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K. *Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4*. J Biol Chem 269:16985-16988, **(1994)**.
202. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. *BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk*. Cytokine Growth Factor Rev 16:251-263, **(2005)**.
203. Hollnagel A, Oehlmann V, Heymer J, Ruther U, Nordheim A. *Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells*. J Biol Chem 274:19838-19845, **(1999)**.
204. Miyazono K, Miyazawa K. *Id: a target of BMP signaling*. Sci STKE 2002:pe40, **(2002)**.
205. Ling F, Kang B, Sun XH. *Id proteins: small molecules, mighty regulators*. Curr Top Dev Biol 110:189-216, **(2014)**.
206. Leboy P, Grasso-Knight G, D'Angelo M, Volk SW, Lian JV, Drissi H, Stein GS, Adams SL. *Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation*. J Bone Joint Surg Am 83-A Suppl 1:S15-22, **(2001)**.
207. Ito Y, Miyazono K. *RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling*. Curr Opin Genet Dev 13:43-47, **(2003)**.
208. Hata A, Kang H. *Functions of the bone morphogenetic protein signaling pathway through microRNAs (review)*. Int J Mol Med 35:563-568, **(2015)**.
209. Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M, Miyazono K. *Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter*. J Biol Chem 275:6075-6079, **(2000)**.
210. Karaulanov E, Knochel W, Niehrs C. *Transcriptional regulation of BMP4 synexpression in transgenic Xenopus*. EMBO J 23:844-856, **(2004)**.
211. Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. *Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors*. Cell Signal 16:291-299, **(2004)**.
212. Shim JH, Greenblatt MB, Xie M, Schneider MD, Zou W, Zhai B, Gygi S, Glimcher LH. *TAK1 is an essential regulator of BMP signalling in cartilage*. EMBO J 28:2028-2041, **(2009)**.
213. Hassel S, Schmitt S, Hartung A, Roth M, Nohe A, Petersen N, Ehrlich M, Henis YI, Sebald W, Knaus P. *Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes*. J Bone Joint Surg Am 85-A Suppl 3:44-51, **(2003)**.
214. Guzman A, Zelman-Femiak M, Boergermann JH, Paschowsky S, Kreuzaler PA, Fratzl P, Harms GS, Knaus P. *SMAD versus non-SMAD signaling is determined by lateral mobility of bone morphogenetic protein (BMP) receptors*. J Biol Chem 287:39492-39504, **(2012)**.

215. Gaggero E, Canalis E. *Bone morphogenetic proteins and their antagonists*. Rev Endocr Metab Disord 7:51-65, **(2006)**.
216. Yanagita M. *BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology*. Cytokine Growth Factor Rev 16:309-317, **(2005)**.
217. Brazil DP, Church RH, Surrae S, Godson C, Martin F. *BMP signalling: agony and antagonism in the family*. Trends Cell Biol 25:249-264, **(2015)**.
218. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Izpisua Belmonte JC, Choe S. *Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin*. Nature 420:636-642, **(2002)**.
219. Church RH, Krishnakumar A, Urbanek A, Geschwindner S, Meneely J, Bianchi A, Basta B, Monaghan S, Elliot C, Stromstedt M, Ferguson N, Martin F, et al. *Gremlin1 preferentially binds to bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and BMP-4 over BMP-7*. Biochem J 466:55-68, **(2015)**.
220. Messina A, Lan L, Incitti T, Bozza A, Andreazzoli M, Vignali R, Cremisi F, Bozzi Y, Casarosa S. *Noggin-Mediated Retinal Induction Reveals a Novel Interplay Between Bone Morphogenetic Protein Inhibition, Transforming Growth Factor beta, and Sonic Hedgehog Signaling*. Stem Cells 33:2496-2508, **(2015)**.
221. Rifas L. *The role of noggin in human mesenchymal stem cell differentiation*. J Cell Biochem 100:824-834, **(2007)**.
222. Deglincerti A, Haremakis T, Warmflash A, Sorre B, Brivanlou AH. *Coco is a dual activity modulator of TGFbeta signaling*. Development 142:2678-2685, **(2015)**.
223. Olsen OE, Wader KF, Hella H, Mylin AK, Turesson I, Nesthus I, Waage A, Sundan A, Holien T. *Activin A inhibits BMP-signaling by binding ACVR2A and ACVR2B*. Cell Commun Signal 13:27, **(2015)**.
224. Wu Q, Sun CC, Lin HY, Babitt JL. *Repulsive guidance molecule (RGM) family proteins exhibit differential binding kinetics for bone morphogenetic proteins (BMPs)*. PLoS One 7:e46307, **(2012)**.
225. Corradini E, Babitt JL, Lin HY. *The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors*. Cytokine Growth Factor Rev 20:389-398, **(2009)**.
226. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. *Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily*. J Biol Chem 274:584-594, **(1999)**.
227. Kirkbride KC, Townsend TA, Bruinsma MW, Barnett JV, Blobe GC. *Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor*. J Biol Chem 283:7628-7637, **(2008)**.
228. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C. *Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI*. Nature 401:480-485, **(1999)**.
229. Sammar M, Stricker S, Schwabe GC, Sieber C, Hartung A, Hanke M, Oishi I, Pohl J, Minami Y, Sebald W, Mundlos S, Knaus P. *Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2*. Genes Cells 9:1227-1238, **(2004)**.
230. Jin W, Yun C, Kim HS, Kim SJ. *TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to suppress bone morphogenetic protein signaling*. Cancer Res 67:9869-9877, **(2007)**.



231. Mochizuki T, Miyazaki H, Hara T, Furuya T, Imamura T, Watabe T, Miyazono K. *Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor-beta superfamily signaling*. J Biol Chem 279:31568-31574, **(2004)**.
232. Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T. *Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads*. Mol Biol Cell 14:2809-2817, **(2003)**.
233. Zhang S, Fei T, Zhang L, Zhang R, Chen F, Ning Y, Han Y, Feng XH, Meng A, Chen YG. *Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation*. Mol Cell Biol 27:4488-4499, **(2007)**.
234. Goto K, Kamiya Y, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K. *Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors*. J Biol Chem 282:20603-20611, **(2007)**.
235. Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. *Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A 98:974-979, **(2001)**.
236. Sanchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, Ten Dijke P. *Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis*. Bone 80:43-59, **(2015)**.
237. Murphy MK, Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. *TGF-beta1, GDF-5, and BMP-2 stimulation induces chondrogenesis in expanded human articular chondrocytes and marrow-derived stromal cells*. Stem Cells 33:762-773, **(2015)**.
238. Vanhatupa S, Ojansivu M, Autio R, Juntunen M, Miettinen S. *Bone Morphogenetic Protein-2 Induces Donor-Dependent Osteogenic and Adipogenic Differentiation in Human Adipose Stem Cells*. Stem Cells Transl Med 4:1391-1402, **(2015)**.
239. Visser R, Bodnarova K, Arrabal PM, Cifuentes M, Becerra J. *Combining bone morphogenetic proteins-2 and -6 has additive effects on osteoblastic differentiation in vitro and accelerates bone formation in vivo*. J Biomed Mater Res A 104:178-185, **(2015)**.
240. Zhao GQ. *Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse*. Genesis 35:43-56, **(2003)**.
241. Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. *Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse*. Genes Dev 9:2105-2116, **(1995)**.
242. Mishina Y, Suzuki A, Ueno N, Behringer RR. *Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis*. Genes Dev 9:3027-3037, **(1995)**.
243. Hogan BL. *Bone morphogenetic proteins in development*. Curr Opin Genet Dev 6:432-438, **(1996)**.
244. Goldman DC, Bailey AS, Pfaffle DL, Al Masri A, Christian JL, Fleming WH. *BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche*. Blood 114:4393-4401, **(2009)**.
245. Larsson J, Karlsson S. *The role of Smad signaling in hematopoiesis*. Oncogene 24:5676-5692, **(2005)**.
246. Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, Bhatia M. *Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells*. Blood 102:906-915, **(2003)**.
247. Marshall CJ, Sinclair JC, Thrasher AJ, Kinnon C. *Bone morphogenetic protein 4 modulates c-Kit expression and differentiation potential in murine embryonic*

- aorta-gonad-mesonephros haematopoiesis in vitro*. Br J Haematol 139:321-330, (2007).
248. Soderberg SS, Karlsson G, Karlsson S. *Complex and context dependent regulation of hematopoiesis by TGF-beta superfamily signaling*. Ann N Y Acad Sci 1176:55-69, (2009).
  249. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, Dick JE. *Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells*. J Exp Med 189:1139-1148, (1999).
  250. Detmer K, Walker AN. *Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors*. Cytokine 17:36-42, (2002).
  251. Martinez VG, Sacedon R, Hidalgo L, Valencia J, Fernandez-Sevilla LM, Hernandez-Lopez C, Vicente A, Varas A. *The BMP Pathway Participates in Human Naive CD4+ T Cell Activation and Homeostasis*. PLoS One 10:e0131453, (2015).
  252. Zetterblad J, Qian H, Zandi S, Mansson R, Lagergren A, Hansson F, Bryder D, Paulsson N, Sigvardsson M. *Genomics based analysis of interactions between developing B-lymphocytes and stromal cells reveal complex interactions and two-way communication*. BMC Genomics 11:108, (2010).
  253. Kersten C, Dosen G, Myklebust JH, Sivertsen EA, Hystad ME, Smeland EB, Rian E. *BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis--upregulation of Id1 and Id3*. Exp Hematol 34:72-81, (2006).
  254. Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH. *BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1*. BMC Immunol 6:9, (2005).
  255. Martinez VG, Hernandez-Lopez C, Valencia J, Hidalgo L, Entrena A, Zapata AG, Vicente A, Sacedon R, Varas A. *The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation*. Immunol Cell Biol 89:610-618, (2011).
  256. Robson NC, Hidalgo L, Mc Alpine T, Wei H, Martinez VG, Entrena A, Melen GJ, MacDonald AS, Phythian-Adams A, Sacedon R, Maraskovsky E, Cebon J, et al. *Optimal effector functions in human natural killer cells rely upon autocrine bone morphogenetic protein signaling*. Cancer Res 74:5019-5031, (2014).
  257. Khurana S, Buckley S, Schouteden S, Ekker S, Petryk A, Delforge M, Zwijsen A, Verfaillie CM. *A novel role of BMP4 in adult hematopoietic stem and progenitor cell homing via Smad independent regulation of integrin-alpha4 expression*. Blood 121:781-790, (2013).
  258. Vicente Lopez MA, Vazquez Garcia MN, Entrena A, Olmedillas Lopez S, Garcia-Arranz M, Garcia-Olmo D, Zapata A. *Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency*. Stem Cells Dev 20:1011-1019, (2010).
  259. Farre J, Roura S, Prat-Vidal C, Soler-Botija C, Llach A, Molina CE, Hove-Madsen L, Cairo JJ, Godia F, Bragos R, Cinca J, Bayes-Genis A. *FGF-4 increases in vitro expansion rate of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Growth Factors 25:71-76, (2007).
  260. Solmesky LJ, Abekasis M, Bulvik S, Weil M. *Bone morphogenetic protein signaling is involved in human mesenchymal stem cell survival in serum-free medium*. Stem Cells Dev 18:1283-1292, (2009).



261. Singh A, Morris RJ. *The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer.* Cytokine Growth Factor Rev 21:299-313, **(2010)**.
262. Grcevic D, Marusic A, Grahovac B, Jaksic B, Kusec R. *Expression of bone morphogenetic proteins in acute promyelocytic leukemia before and after combined all trans-retinoic acid and cytotoxic treatment.* Leuk Res 27:731-738, **(2003)**.
263. Kang MH, Oh SC, Lee HJ, Kang HN, Kim JL, Kim JS, Yoo YA. *Metastatic function of BMP-2 in gastric cancer cells: the role of PI3K/AKT, MAPK, the NF-kappaB pathway, and MMP-9 expression.* Exp Cell Res 317:1746-1762, **(2011)**.
264. Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, Kadlubar S, Caan BJ, Potter JD, Wolff RK. *Genetic variation in bone morphogenetic protein and colon and rectal cancer.* Int J Cancer 130:653-664, **(2012)**.
265. Laperrousaz B, Jeanpierre S, Sagorny K, Voeltzel T, Ramas S, Kaniewski B, Ffrench M, Salesse S, Nicolini FE, Maguer-Satta V. *Primitive CML cell expansion relies on abnormal levels of BMPs provided by the niche and on BMPRIb overexpression.* Blood 122:3767-3777, **(2013)**.
266. Xian S, Jilu L, Zhennan T, Yang Z, Yang H, Jingshu G, Songbin F. *BMP-4 genetic variants and protein expression are associated with platinum-based chemotherapy response and prognosis in NSCLC.* Biomed Res Int 2014:801640, **(2014)**.
267. Asano N, Yamakazi T, Seto M, Matsumine A, Yoshikawa H, Uchida A. *The expression and prognostic significance of bone morphogenetic protein-2 in patients with malignant fibrous histiocytoma.* J Bone Joint Surg Br 86:607-612, **(2004)**.
268. Seckinger A, Meissner T, Moreaux J, Goldschmidt H, Fuhler GM, Benner A, Hundemer M, Reme T, Shaughnessy JD, Jr., Barlogie B, Bertsch U, Hillengass J, et al. *Bone morphogenic protein 6: a member of a novel class of prognostic factors expressed by normal and malignant plasma cells inhibiting proliferation and angiogenesis.* Oncogene 28:3866-3879, **(2009)**.
269. Bao Z, Zhang C, Yan W, Liu Y, Li M, Zhang W, Jiang T. *BMP4, a strong better prognosis predictor, has a subtype preference and cell development association in gliomas.* J Transl Med 11:100, **(2013)**.
270. Laatio L, Myllynen P, Serpi R, Rysa J, Ilves M, Lappi-Blanco E, Ruskoaho H, Vahakangas K, Puistola U. *BMP-4 expression has prognostic significance in advanced serous ovarian carcinoma and is affected by cisplatin in OVCAR-3 cells.* Tumour Biol 32:985-995, **(2011)**.
271. Gerber JM, Gucwa JL, Esopi D, Gurel M, Haffner MC, Vala M, Nelson WG, Jones RJ, Yegnasubramanian S. *Genome-wide comparison of the transcriptomes of highly enriched normal and chronic myeloid leukemia stem and progenitor cell populations.* Oncotarget 4:715-728, **(2013)**.
272. Davies JO, Stringaris K, Barrett AJ, Rezvani K. *Opportunities and limitations of natural killer cells as adoptive therapy for malignant disease.* Cytotherapy 16:1453-1466, **(2014)**.
273. Dzieczenia J, Wrobel T, Jazwiec B, Mazur G, Butrym A, Kuliczkowski K. *Expression of cyclin A and bone morphogenetic protein receptors and response to induction therapy in patients with acute leukemias.* Leuk Lymphoma 52:2336-2341, **(2011)**.
274. Dzieczenia J, Wrobel T, Jazwiec B, Mazur G, Butrym A, Poreba R, Kuliczkowski K. *Expression of bone morphogenetic proteins (BMPs) receptors in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL).* Int J Lab Hematol 32:e217-221, **(2010)**.

275. Ide H, Katoh M, Sasaki H, Yoshida T, Aoki K, Nawa Y, Osada Y, Sugimura T, Terada M. *Cloning of human bone morphogenetic protein type IB receptor (BMPR-IB) and its expression in prostate cancer in comparison with other BMPRs*. *Oncogene* 14:1377-1382, **(1997)**.
276. Kim IY, Lee DH, Lee DK, Ahn HJ, Kim MM, Kim SJ, Morton RA. *Loss of expression of bone morphogenetic protein receptor type II in human prostate cancer cells*. *Oncogene* 23:7651-7659, **(2004)**.
277. Taylor KR, Mackay A, Truffaux N, Butterfield YS, Morozova O, Philippe C, Castel D, Grasso CS, Vinci M, Carvalho D, Carcaboso AM, de Torres C, et al. *Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma*. *Nat Genet* 46:457-461, **(2014)**.
278. Buczkowicz P, Bartels U, Bouffet E, Becher O, Hawkins C. *Histopathological spectrum of paediatric diffuse intrinsic pontine glioma: diagnostic and therapeutic implications*. *Acta Neuropathol* 128:573-581, **(2014)**.
279. Fontebasso AM, Papillon-Cavanagh S, Schwartzentruber J, Nikbakht H, Gerges N, Fiset PO, Bechet D, Faury D, De Jay N, Ramkissoon LA, Corcoran A, Jones DT, et al. *Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma*. *Nat Genet* 46:462-466, **(2014)**.
280. Hover LD, Abel TW, Owens P. *Genomic Analysis of the BMP Family in Glioblastomas*. *Transl Oncogenomics* 7:1-9, **(2015)**.
281. Hover LD, Young CD, Bhola NE, Wilson AJ, Khabele D, Hong CC, Moses HL, Owens P. *Small molecule inhibitor of the bone morphogenetic protein pathway DMH1 reduces ovarian cancer cell growth*. *Cancer Lett* 368:79-87, **(2015)**.
282. Deng H, Ravikumar TS, Yang WL. *Overexpression of bone morphogenetic protein 4 enhances the invasiveness of Smad4-deficient human colorectal cancer cells*. *Cancer Lett* 281:220-231, **(2009)**.
283. Voorneveld PW, Stache V, Jacobs RJ, Smolders E, Sitters AI, Liesker A, Korkmaz KS, Lam SM, De Miranda NF, Morreau H, Kodach LL, Hardwick JC. *Reduced expression of bone morphogenetic protein receptor IA in pancreatic cancer is associated with a poor prognosis*. *Br J Cancer* 109:1805-1812, **(2013)**.
284. Xu T, Yu CY, Sun JJ, Liu Y, Wang XW, Pi LM, Tian YQ, Zhang X. *Bone morphogenetic protein-4-induced epithelial-mesenchymal transition and invasiveness through Smad1-mediated signal pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Arch Med Res* 42:128-137, **(2011)**.
285. Peng J, Yoshioka Y, Mandai M, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Hamanishi J, Kharma B, Murakami R, Abiko K, Murphy SK, Konishi I. *The BMP signaling pathway leads to enhanced proliferation in serous ovarian cancer-a potential therapeutic target*. *Mol Carcinog*, **(2015)**.
286. Yan K, Wu Q, Yan DH, Lee CH, Rahim N, Tritschler I, DeVecchio J, Kalady MF, Hjelmeland AB, Rich JN. *Glioma cancer stem cells secrete Gremlin1 to promote their maintenance within the tumor hierarchy*. *Genes Dev* 28:1085-1100, **(2014)**.
287. Sato M, Kawana K, Fujimoto A, Yoshida M, Nakamura H, Nishida H, Inoue T, Taguchi A, Takahashi J, Adachi K, Nagasaka K, Matsumoto Y, et al. *Clinical significance of Gremlin 1 in cervical cancer and its effects on cancer stem cell maintenance*. *Oncol Rep* 35:391-397, **(2016)**.
288. Yuen HF, McCrudden CM, Grills C, Zhang SD, Huang YH, Chan KK, Chan YP, Wong ML, Law S, Srivastava G, Fennell DA, Dickson G, et al. *Combinatorial use of bone*

- morphogenetic protein 6, noggin and SOST significantly predicts cancer progression.* Cancer Sci 103:1145-1154, **(2012)**.
289. Chiu CY, Kuo KK, Kuo TL, Lee KT, Cheng KH. *The activation of MEK/ERK signaling pathway by bone morphogenetic protein 4 to increase hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration.* Mol Cancer Res 10:415-427, **(2012)**.
  290. Fukuda N, Saitoh M, Kobayashi N, Miyazono K. *Execution of BMP-4-induced apoptosis by p53-dependent ER dysfunction in myeloma and B-cell hybridoma cells.* Oncogene 25:3509-3517, **(2006)**.
  291. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL. *Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells.* Nature 444:761-765, **(2006)**.
  292. Lombardo Y, Scopelliti A, Cammareri P, Todaro M, Iovino F, Ricci-Vitiani L, Gulotta G, Dieli F, de Maria R, Stassi G. *Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice.* Gastroenterology 140:297-309, **(2011)**.
  293. Zhou Z, Sun L, Wang Y, Wu Z, Geng J, Miu W, Pu Y, You Y, Yang Z, Liu N. *Bone morphogenetic protein 4 inhibits cell proliferation and induces apoptosis in glioma stem cells.* Cancer Biother Radiopharm 26:77-83, **(2011)**.
  294. Takahashi Y, Ishigaki T, Okuhashi Y, Ono A, Itoh M, Nara N, Tohda S. *Effect of BMP4 on the growth and clonogenicity of human leukemia and lymphoma cells.* Anticancer Res 32:2813-2817, **(2012)**.
  295. Iantosca MR, McPherson CE, Ho SY, Maxwell GD. *Bone morphogenetic proteins-2 and -4 attenuate apoptosis in a cerebellar primitive neuroectodermal tumor cell line.* J Neurosci Res 56:248-258, **(1999)**.
  296. Hjertner O, Hjorth-Hansen H, Borset M, Seidel C, Waage A, Sundan A. *Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells.* Blood 97:516-522, **(2001)**.
  297. Haubold M, Weise A, Stephan H, Dunker N. *Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) signaling in retinoblastoma cells.* Int J Biol Sci 6:700-715, **(2010)**.
  298. Huse K, Bakkebo M, Walchli S, Oksvold MP, Hilden VI, Forfang L, Bredahl ML, Liestol K, Alizadeh AA, Smeland EB, Myklebust JH. *Role of Smad proteins in resistance to BMP-induced growth inhibition in B-cell lymphoma.* PLoS One 7:e46117, **(2012)**.
  299. Zhao H, Ayrault O, Zindy F, Kim JH, Roussel MF. *Post-transcriptional down-regulation of Atoh1/Math1 by bone morphogenic proteins suppresses medulloblastoma development.* Genes Dev 22:722-727, **(2008)**.
  300. Videla Richardson GA, Garcia CP, Roisman A, Slavutsky I, Fernandez Espinosa DD, Romorini L, Miriuka SG, Arakaki N, Martinetto H, Scassa ME, Sevillever GE. *Specific Preferences in Lineage Choice and Phenotypic Plasticity of Glioma Stem Cells Under BMP4 and Noggin Influence.* Brain Pathol 26:43-61, **(2016)**.
  301. Rothhammer T, Braig S, Bosserhoff AK. *Bone morphogenetic proteins induce expression of metalloproteinases in melanoma cells and fibroblasts.* Eur J Cancer 44:2526-2534, **(2008)**.
  302. Maegdefrau U, Amann T, Winklmeier A, Braig S, Schubert T, Weiss TS, Schardt K, Warnecke C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK. *Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression.* J Pathol 218:520-529, **(2009)**.

303. Guo D, Huang J, Gong J. *Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is required for migration and invasion of breast cancer*. Mol Cell Biochem 363:179-190, (2012).
304. de Vasconcellos JF, Laranjeira AB, Zanchin NI, Otubo R, Vaz TH, Cardoso AA, Brandalise SR, Yunes JA. *Increased CCL2 and IL-8 in the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia*. Pediatr Blood Cancer 56:568-577, (2011).
305. Corrado C, Raimondo S, Saieva L, Flugy AM, De Leo G, Alessandro R. *Exosome-mediated crosstalk between chronic myelogenous leukemia cells and human bone marrow stromal cells triggers an interleukin 8-dependent survival of leukemia cells*. Cancer Lett 348:71-76, (2014).
306. Trimarco V, Ave E, Facco M, Chiodin G, Frezzato F, Martini V, Gattazzo C, Lessi F, Giorgi CA, Visentin A, Castelli M, Severin F, et al. *Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia (CLL) tumor B cells and mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for neoplastic cell survival*. Oncotarget 6:42130-42149, (2015).
307. Kijima M, Yamaguchi T, Ishifune C, Maekawa Y, Koyanagi A, Yagita H, Chiba S, Kishihara K, Shimada M, Yasutomo K. *Dendritic cell-mediated NK cell activation is controlled by Jagged2-Notch interaction*. Proc Natl Acad Sci U S A 105:7010-7015, (2008).
308. Haraguchi K, Suzuki T, Koyama N, Kumano K, Nakahara F, Matsumoto A, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto M, Masuda S, Takahashi T, Kamijo A, Takahashi K, et al. *Notch activation induces the generation of functional NK cells from human cord blood CD34-positive cells devoid of IL-15*. J Immunol 182:6168-6178, (2009).
309. Manaster I, Gazit R, Goldman-Wohl D, Stern-Ginossar N, Mizrahi S, Yagel S, Mandelboim O. *Notch activation enhances IFN $\gamma$  secretion by human peripheral blood and decidual NK cells*. J Reprod Immunol 84:1-7, (2009).
310. Andreu Z, Khan MA, Gonzalez-Gomez P, Negueruela S, Hortiguera R, San Emeterio J, Ferron SR, Martinez G, Vidal A, Farinas I, Lie DC, Mira H. *The cyclin-dependent kinase inhibitor p27 kip1 regulates radial stem cell quiescence and neurogenesis in the adult hippocampus*. Stem Cells 33:219-229, (2015).
311. Rusakiewicz S, Semeraro M, Sarabi M, Desbois M, Locher C, Mendez R, Vimond N, Concha A, Garrido F, Isambert N, Chaigneau L, Le Brun-Ly V, et al. *Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors*. Cancer Res 73:3499-3510, (2013).
312. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M, Marini FC. *Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging*. Stem Cells 27:2614-2623, (2009).
313. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, Korkaya H, Heath A, Dutcher J, Kleer CG, Jung Y, Dontu G, et al. *Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks*. Cancer Res 71:614-624, (2011).
314. Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. *Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth*. Leukemia 21:304-310, (2007).
315. Corcoran KE, Trzaska KA, Fernandes H, Bryan M, Taborga M, Srinivas V, Packman K, Patel PS, Rameshwar P. *Mesenchymal stem cells in early entry of breast cancer into bone marrow*. PLoS One 3:e2563, (2008).

316. Hung SC, Deng WP, Yang WK, Liu RS, Lee CC, Su TC, Lin RJ, Yang DM, Chang CW, Chen WH, Wei HJ, Gelovani JG. *Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging*. Clin Cancer Res 11:7749-7756, **(2005)**.
317. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. *Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals*. Blood 102:3837-3844, **(2003)**.
318. Sun B, Roh KH, Park JR, Lee SR, Park SB, Jung JW, Kang SK, Lee YS, Kang KS. *Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells in a mouse breast cancer metastasis model*. Cytotherapy 11:289-298, 281 p following 298, **(2009)**.
319. Campioni D, Moretti S, Ferrari L, Punturieri M, Castoldi GL, Lanza F. *Immunophenotypic heterogeneity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with hematologic disorders: correlation with bone marrow microenvironment*. Haematologica 91:364-368, **(2006)**.
320. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, Robledo C, Villaron EM, Hernandez-Campo P, Lopez-Holgado N, Diez-Campelo M, Barbado MV, Perez-Simon JA, Hernandez-Rivas JM, San-Miguel JF, et al. *Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome*. Leukemia 23:664-672, **(2009)**.
321. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Flores-Guzman P, Gutierrez-Espindola G, Arana-Trejo RM, Castillo-Medina S, Perez-Cabrera A, Hernandez-Estevez E, Arriaga L, Mayani H. *Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells*. Leuk Res 32:1407-1416, **(2008)**.
322. Klaus M, Stavroulaki E, Kastrinaki MC, Fragioudaki P, Giannikou K, Psyllaki M, Pontikoglou C, Tsoukatou D, Mamalaki C, Papadaki HA. *Reserves, functional, immunoregulatory, and cytogenetic properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes*. Stem Cells Dev 19:1043-1054, **(2010)**.
323. Vicente Lopez A, Vazquez Garcia MN, Melen GJ, Entrena Martinez A, Cubillo Moreno I, Garcia-Castro J, Orellana MR, Gonzalez AG. *Mesenchymal stromal cells derived from the bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients show altered BMP4 production: correlations with the course of disease*. PLoS One 9:e84496, **(2014)**.
324. Zhao ZG, Liang Y, Li K, Li WM, Li QB, Chen ZC, Zou P. *Phenotypic and functional comparison of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases*. Stem Cells Dev 16:637-648, **(2007)**.
325. Giuliani N, Mangoni M, Rizzoli V. *Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in multiple myeloma: identification of potential therapeutic targets*. Exp Hematol 37:879-886, **(2009)**.
326. Le Y, Fraigneau S, Chandran P, Sabloff M, Brand M, Lavoie JR, Gagne R, Rosu-Myles M, Yauk CL, Richardson RB, Allan DS. *Adipogenic Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow and Their Hematopoietic Supportive Role: Towards Understanding the Permissive Marrow Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia*. Stem Cell Rev, **(2015)**.
327. Zhao ZG, Xu W, Yu HP, Fang BL, Wu SH, Li F, Li WM, Li QB, Chen ZC, Zou P. *Functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes*. Cancer Lett 317:136-143, **(2012)**.

328. Andre T, Meuleman N, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Pieters K, Bron D, Lagneaux L. *Evidences of early senescence in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells*. PLoS One 8:e59756, **(2013)**.
329. Lokhorst HM, Lamme T, de Smet M, Klein S, de Weger RA, van Oers R, Bloem AC. *Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures*. Blood 84:2269-2277, **(1994)**.
330. Bisping G, Leo R, Wenning D, Dankbar B, Padro T, Kropff M, Scheffold C, Kroger M, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. *Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma*. Blood 101:2775-2783, **(2003)**.
331. Zdzisinska B, Bojarska-Junak A, Dmoszynska A, Kandefer-Szerszen M. *Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 56:207-221, **(2008)**.
332. Rouce RH, Shaim H, Sekine T, Weber G, Ballard B, Ku S, Barese C, Murali V, Wu MF, Liu H, Shpall EJ, Bollard CM, et al. *The TGF-beta/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, **(2015)**.
333. Zhu B, Zhang J, Chen J, Li C, Wang X. *Molecular biological characteristics of the recruitment of hematopoietic stem cells from bone marrow niche in chronic myeloid leukemia*. Int J Clin Exp Pathol 8:12595-12607, **(2015)**.
334. TrabANELLI S, Lecciso M, Salvestrini V, Cavo M, OcAdlikova D, Lemoli RM, Curti A. *PGE2-induced IDO1 inhibits the capacity of fully mature DCs to elicit an in vitro antileukemic immune response*. J Immunol Res 2015:253191, **(2015)**.
335. Shehzad A, Lee J, Lee YS. *Autocrine prostaglandin E(2) signaling promotes promonocytic leukemia cell survival via COX-2 expression and MAPK pathway*. BMB Rep 48:109-114, **(2015)**.
336. Reynaud D, Pietras E, Barry-Holson K, Mir A, Binnewies M, Jeanne M, Sala-Torra O, Radich JP, Passegue E. *IL-6 controls leukemic multipotent progenitor cell fate and contributes to chronic myelogenous leukemia development*. Cancer Cell 20:661-673, **(2011)**.
337. Olsnes AM, Motorin D, Rynningen A, Zaritskey AY, Bruserud O. *T lymphocyte chemotactic chemokines in acute myelogenous leukemia (AML): local release by native human AML blasts and systemic levels of CXCL10 (IP-10), CCL5 (RANTES) and CCL17 (TARC)*. Cancer Immunol Immunother 55:830-840, **(2006)**.
338. Schulz A, Toedt G, Zenz T, Stilgenbauer S, Lichter P, Seiffert M. *Inflammatory cytokines and signaling pathways are associated with survival of primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro: a dominant role of CCL2*. Haematologica 96:408-416, **(2010)**.
339. Supper E, Tahir S, Imai T, Inoue J, Minato N. *Modification of Gene Expression, Proliferation, and Function of OP9 Stroma Cells by Bcr-Abl-Expressing Leukemia Cells*. PLoS One 10:e0134026, **(2015)**.
340. Trentin L, Agostini C, Facco M, Piazza F, Perin A, Siviero M, Gurrieri C, Galvan S, Adami F, Zambello R, Semenzato G. *The chemokine receptor CXCR3 is expressed on malignant B cells and mediates chemotaxis*. J Clin Invest 104:115-121, **(1999)**.
341. Wierda WG, Johnson MM, Do KA, Manshouri T, Dey A, O'Brien S, Giles FJ, Kantarjian H, Thomas D, Faderl S, Lerner S, Keating M, et al. *Plasma interleukin 8 level predicts for survival in chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol 120:452-456, **(2003)**.



342. Eisenkraft A, Keidan I, Bielora B, Keller N, Toren A, Paret G. *MCP-1 in the cerebrospinal fluid of children with acute lymphoblastic leukemia*. Leuk Res 30:1259-1261, **(2006)**.
343. Pardanani A, Finke C, Lasho TL, Al-Kali A, Begna KH, Hanson CA, Tefferi A. *IPSS-independent prognostic value of plasma CXCL10, IL-7 and IL-6 levels in myelodysplastic syndromes*. Leukemia 26:693-699, **(2012)**.
344. Khandany BK, Hassanshahi G, Khorramdelazad H, Balali Z, Shamsizadeh A, Arababadi MK, Ostadebrahimi H, Fatehi A, Rezazadeh M, Ahmadi Z, Karimabad MN. *Evaluation of circulating concentrations of CXCL1 (Gro-alpha), CXCL10 (IP-10) and CXCL12 (SDF-1) in ALL patients prior and post bone marrow transplantation*. Pathol Res Pract 208:615-619, **(2012)**.
345. Gomez AM, Martinez C, Gonzalez M, Luque A, Melen GJ, Martinez J, Hortelano S, Lassaletta A, Madero L, Ramirez M. *Chemokines and relapses in childhood acute lymphoblastic leukemia: A role in migration and in resistance to antileukemic drugs*. Blood Cells Mol Dis 55:220-227, **(2015)**.
346. Si MY, Fan ZC, Li YZ, Chang XL, Xie QD, Jiao XY. *The prognostic significance of serum and cerebrospinal fluid MMP-9, CCL2 and sVCAM-1 in leukemia CNS metastasis*. J Neurooncol 122:229-244, **(2015)**.
347. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta 1813:878-888, **(2011)**.
348. Smyth MJ, Ortaldo JR. *Comparison of the effect of IL-2 and IL-6 on the lytic activity of purified human peripheral blood large granular lymphocytes*. J Immunol 146:1380-1384, **(1991)**.
349. Scheid C, Young R, McDermott R, Fitzsimmons L, Scarffe JH, Stern PL. *Immune function of patients receiving recombinant human interleukin-6 (IL-6) in a phase I clinical study: induction of C-reactive protein and IgE and inhibition of natural killer and lymphokine-activated killer cell activity*. Cancer Immunol Immunother 38:119-126, **(1994)**.
350. Lin CY, Chuang TF, Liao KW, Huang YJ, Pai CC, Chu RM. *Combined immunogene therapy of IL-6 and IL-15 enhances anti-tumor activity through augmented NK cytotoxicity*. Cancer Lett 272:285-295, **(2008)**.
351. Zhou Y, Day A, Haykal S, Keating A, Waddell TK. *Mesenchymal stromal cells augment CD4+ and CD8+ T-cell proliferation through a CCL2 pathway*. Cytotherapy 15:1195-1207, **(2013)**.
352. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. Nature 382:635-638, **(1996)**.
353. Zhang B, Ho YW, Huang Q, Maeda T, Lin A, Lee SU, Hair A, Holyoake TL, Huettner C, Bhatia R. *Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia*. Cancer Cell 21:577-592, **(2012)**.
354. van den Berk LC, van der Veer A, Willemse ME, Theeuwes MJ, Luijendijk MW, Tong WH, van der Sluis IM, Pieters R, den Boer ML. *Disturbed CXCR4/CXCL12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol 166:240-249, **(2014)**.
355. Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin MN, Stagg J, Galipeau J. *Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal*

- stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density.* J Immunol 179:1549-1558, **(2007)**.
356. Chan WK, Lau AS, Li JC, Law HK, Lau YL, Chan GC. *MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN-gamma challenge.* Exp Hematol 36:1545-1555, **(2008)**.
  357. Franco G, Guarnotta C, Frossi B, Piccaluga PP, Boveri E, Gulino A, Fuligni F, Rigoni A, Porcasi R, Buffa S, Betto E, Florena AM, et al. *Bone marrow stroma CD40 expression correlates with inflammatory mast cell infiltration and disease progression in splenic marginal zone lymphoma.* Blood 123:1836-1849, **(2014)**.
  358. Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, Spits H, Karre K, Zappacosta S. *A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction.* J Exp Med 185:2053-2060, **(1997)**.
  359. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Desbois M, Delahaye N, Viaud S, Ryffel B, Yagita H, Kaplanski G, Prevost-Blondel A, Kato M, et al. *IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer.* Cancer Res 71:5393-5399, **(2011)**.
  360. Pardoll DM. *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy.* Nat Rev Cancer 12:252-264, **(2012)**.
  361. Han KH, Ro H, Hong JH, Lee EM, Cho B, Yeom HJ, Kim MG, Oh KH, Ahn C, Yang J. *Immunosuppressive mechanisms of embryonic stem cells and mesenchymal stem cells in alloimmune response.* Transpl Immunol 25:7-15, **(2011)**.
  362. Raicevic G, Najar M, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, Tougouz M, Lagneaux L. *The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties.* Cell Immunol 270:207-216, **(2011)**.
  363. Tomchuck SL, Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. *Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses.* Stem Cells 26:99-107, **(2008)**.
  364. Giuliani M, Bennaceur-Griscelli A, Nanbakhsh A, Oudrhiri N, Chouaib S, Azzarone B, Durrbach A, Lataillade JJ. *TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing.* Stem Cells 32:290-300, **(2014)**.
  365. Tsao PN, Wei SC, Huang MT, Lee MC, Chou HC, Chen CY, Hsieh WS. *Lipopolysaccharide-induced Notch signaling activation through JNK-dependent pathway regulates inflammatory response.* J Biomed Sci 18:56, **(2011)**.
  366. Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, et al. *Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force.* J Transl Med 10:205, **(2012)**.
  367. Senovilla L, Vacchelli E, Galon J, Adjemian S, Eggermont A, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Ma Y, Tartour E, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L. *Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer.* Oncoimmunology 1:1323-1343, **(2012)**.
  368. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, et al. *Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours.* J Pathol 232:199-209, **(2014)**.
  369. Bremnes RM, Busund LT, Kilvaer TL, Andersen S, Richardsen E, Paulsen EE, Hald S, Khanekkenari MR, Cooper WA, Kao SC, Donnem T. *The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer.* J Thorac Oncol, **(2016)**.



370. von Bubnoff A, Cho KW. *Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network?* Dev Biol 239:1-14, (2001).
371. Sivertsen EA, Huse K, Hystad ME, Kersten C, Smeland EB, Myklebust JH. *Inhibitory effects and target genes of bone morphogenetic protein 6 in Jurkat TAG cells.* Eur J Immunol 37:2937-2948, (2007).
372. Varas A, Valencia J, Lavocat F, Martinez VG, Thiam NN, Hidalgo L, Fernandez-Sevilla LM, Sacedon R, Vicente A, Miossec P. *Blockade of bone morphogenetic protein signaling potentiates the pro-inflammatory phenotype induced by interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha combination in rheumatoid synoviocytes.* Arthritis Res Ther 17:192, (2015).
373. McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, Bai S, Cabrera L, Keller E, McCauley L, Cho KR, Buckanovich RJ. *Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production.* J Clin Invest 121:3206-3219, (2011).
374. Coffman LG, Choi YJ, McLean K, Allen BL, di Magliano MP, Buckanovich RJ. *Human carcinoma-associated mesenchymal stem cells promote ovarian cancer chemotherapy resistance via a BMP4/HH signaling loop.* Oncotarget 7:6916-6932, (2016).
375. Martinez-Laperche C. *Estudio de la infiltración del sistema nervioso central en niños con leucemia linfoblástica aguda y el papel de BMP4.* Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, (2011).
376. Ramirez M. *BMP-4 levels and pathway status in childhood B-ALL of low-/intermediate- groups identify children with poor outcome.* 9th Biennial Childhood Leukemia Symposium. Praga (Czech Republic), (2014).
377. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice.* Nature 367:645-648, (1994).
378. Kellner J, Liu B, Kang Y, Li Z. *Fact or fiction--identifying the elusive multiple myeloma stem cell.* J Hematol Oncol 6:91, (2013).
379. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer.* Cell 100:57-70, (2000).
380. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape.* Curr Opin Immunol 27:16-25, (2014).
381. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion.* Science 331:1565-1570, (2011).
382. Crane CA, Austgen K, Habberthur K, Hofmann C, Moyes KW, Avanesyan L, Fong L, Campbell MJ, Cooper S, Oakes SA, Parsa AT, Lanier LL. *Immune evasion mediated by tumor-derived lactate dehydrogenase induction of NKG2D ligands on myeloid cells in glioblastoma patients.* Proc Natl Acad Sci U S A 111:12823-12828, (2014).
383. Reiniers KS, Topolar D, Henke A, Simhadri VR, Kessler J, Sauer M, Bessler M, Hansen HP, Tawadros S, Herling M, Kronke M, Hallek M, et al. *Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity.* Blood 121:3658-3665, (2013).
384. Yan WH, Lin A, Chen BG, Luo WD, Dai MZ, Chen XJ, Xu HH, Li BL. *Unfavourable clinical implications for HLA-G expression in acute myeloid leukaemia.* J Cell Mol Med 12:889-898, (2008).

- 385. Maki G, Hayes GM, Naji A, Tyler T, Carosella ED, Rouas-Freiss N, Gregory SA. *NK resistance of tumor cells from multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia patients: implication of HLA-G*. Leukemia 22:998-1006, **(2008)**.
- 386. Wlasiuk P, Stec A, Piechnik A, Kaminska W, Dmoszynska A, Ksiazek A, Giannopoulos K. *Expression of soluble HLA-G in multiple myeloma patients and patients with renal failure*. Leuk Res 36:881-883, **(2012)**.
- 387. Gao M, Gao L, Yang G, Tao Y, Hou J, Xu H, Hu X, Han Y, Zhang Q, Zhan F, Wu X, Shi J. *Myeloma cells resistance to NK cell lysis mainly involves an HLA class I-dependent mechanism*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 46:597-604, **(2014)**.
- 388. Ray M, Hostetter DR, Loeb CR, Simko J, Craik CS. *Inhibition of Granzyme B by PI-9 protects prostate cancer cells from apoptosis*. Prostate 72:846-855, **(2012)**.



**ANEXO I**



Tumor	Alteración	Relevancia clínica	Referencia
LLA	↑BMP7	Mal pronóstico, favorece EMR	<i>Grcevic et al. Leuk Res 27 731-8 2003</i>
LMA	↑BMP2/4/7	Mal pronóstico, favorece EMR	<i>Grcevic et al. Leuk Res 27 731-8 2003</i>
LPMA	↑BMP2/4/7	Mal pronóstico, favorece EMR	<i>Grcevic et al. Leuk Res 27 731-8 2003</i>
LMC	↓BMP2	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Gerber et al. Oncotarget 4 715-28 2013</i>
LMC	↑BMP2/BMP4	Mal pronóstico, aumento población LSCs	<i>Laperrousaz et al. Blood 122 3767-77 2013</i>
SMD	↑BMP2	Mal pronóstico, favorece EMR	<i>Grcevic et al. Leuk Res 27 731-8 2003</i>
MM GMSI	↑BMP6	Buen pronóstico, mayor supervivencia	<i>Seckinger et al. Oncogene 28 3866-79 2009</i>
MM	↑BMP4/6	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Grcevic et al. Leuk Res 34 742-51 2010</i>
MM	↑BMP2/4/7	Mal pronóstico, favorece EMR	<i>Grcevic et al. Leuk Res 27 731-8 2003</i>
Linfoma B	↑BMP6/7	Mal pronóstico, no se relaciona con supervivencia	<i>Huse et al. PLoS One 7 e46117 2012</i>
Ovario	↑BMP7	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Hover et al. Cancer Lett 368 79-87 2015</i>
Ovario	↑BMP2	Mal pronóstico, menor supervivencia en pacientes con enfermedad avanzada	<i>Le Page et al. J Ovarian Res 2 4 2009</i>
Ovario	↑BMP9	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Herrera et al. Cancer Res 69 9254-62 2009</i>
Ovario	↑BMP2/4	Mal pronóstico, no relacionado con clínica	<i>Shepherd and Nachtigal Endocrinology 144 3306-14 2003</i>
Ovario	↓BMP4	Mal pronóstico, menor supervivencia de los pacientes previa a tratamiento	<i>Laatio et al. Tumour Biol 32 985-95 2011</i>
Útero	↑BMP2	No correlaciona con la evolución de la enfermedad ni la supervivencia	<i>Fadare et al. Appl Immunohistochem Mol Morphol 19 352-9 2011</i>
Mama	↑BMP7	Mal pronóstico, aumento riesgo de metástasis ósea	<i>Alarmo et al. Ann Oncol 19 308-14 2008</i>
Mama	↑BMP4/7	No correlaciona con la agresividad del tumor	<i>Alarmo et al. Breast Cancer Res Treat 103 239-46 2007</i>
Mama	↑BMP2	No relacionado con clínica	<i>Arnold et al. Cytokine 11 1031-7 1999</i>

Tumor	Alteración	Relevancia clínica	Referencia
Mama	↑BMP7	No correlaciona con la evolución de la enfermedad	<i>Bobinac et al. Croat Med J</i> 46 389-96 2005
Mama	↑BMP4	Mal pronóstico, no relacionado con clínica	<i>Farnsworth et al. Cancer Res</i> 71 6547-57 2011
Mama	↑BMP7	No relacionado con clínica	<i>Alarmo et al. Genes Chromosomes Cancer</i> 45 411-9 2006
Mama	↓BMP2, ↑BMP7	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Davies et al. J Exp Ther Oncol</i> 7 327-38 2008
Colon	↑BMP2/4	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Slattery et al. Int J Cancer</i> 130 653-64 2012
Colon	↑BMP5/6	No relacionado con clínica	<i>Imai et al. Pathol Int</i> 51 643-8 2001
Recto	↑BMP4	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Slattery et al. Int J Cancer</i> 130 653-64 2012
Colorrectal	↑BMP4	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Lubbe et al. Oncogene</i> 31 3777-84 2012
Colorrectal	↑BMP4	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Houlston et al. Nat Genet</i> 40 1426-35 2008
Colorrectal	↑BMP6	Mal pronóstico, menor supervivencia por aumento población CSCs	<i>Yuen et al. Cancer Sci</i> 103 1145-54 2012
Colorrectal	↑BMP4	Mal pronóstico, no relacionado con supervivencia	<i>Deng et al. Cancer Lett</i> 281 220-31 2009
Colorrectal	↑BMP4	Buen pronóstico, no relacionado con supervivencia	<i>Lombardo et al. Gastroenterology</i> 140 297-309 2011
Gástrico	↑BMP2/4	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Kang et al. Exp Cell Res</i> 317 1746-62 2011
Gástrico	↑BMP4	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Kim et al. Surg Today</i> 41 688-92 2011
Gástrico	↓BMP10	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Lei et al. Tumour Biol</i> 2015
Glioma	↑BMP2	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Zhang et al. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi</i> 25 637-9 2009
Glioma	↑BMP2	Mal pronóstico, menor supervivencia en pacientes con enfermedad avanzada	<i>Liu et al. Jpn J Clin Oncol</i> 39 625-31 2009
Glioma	↓BMP8b	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Hover et al. Transl Oncogenomics</i> 7 1-9 2015
Glioma	↑BMP4	Buen pronóstico, mayor supervivencia en pacientes con enfermedad avanzada	<i>Bao et al. J Transl Med</i> 11 100 2013

Tumor	Alteración	Relevancia clínica	Referencia
Hígado	↑BMP4	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Chiu et al. Mol Cancer Res 10 415-27 2012</i>
Hígado	↑BMP4	Mal pronóstico, menor supervivencia, favorece metástasis	<i>Guo et al. Pathol Oncol Res 18 635-40 2012</i>
Hígado	↑BMP9	Mal pronóstico, no relacionado con clínica	<i>Herrera et al. PLoS One 8 e69535 2013</i>
Hígado	↑BMP4	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Maegdefrau et al. J Pathol 218 520-9 2009</i>
Renal	↑BMP4/6/7	Buen pronóstico, mayor supervivencia	<i>Kwak et al. J Urol 178 1062-7 2007</i>
Renal	↓BMP2	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad y metástasis	<i>Mitsui et al. Oncotarget 6 9577-91 2015</i>
Vejiga	↑BMP6	Mal pronóstico, menor supervivencia por aumento población CSCs	<i>Yuen et al. Cancer Sci 103 1145-54 2012</i>
Vejiga	↓BMP2/7	Mal pronóstico, aumenta riesgo de recaída	<i>Kuzaka et al. Arch Med Sci 11 378-84 2015</i>

**Tabla 1: Alteración en la expresión de los ligandos BMP en tumores sólidos y hematológicos.** BMP: Proteína morfogenética ósea; LLA: Leucemia linfoblástica aguda; LMA: Leucemia mieloide aguda; LPMA: Leucemia promielocítica aguda; LMC: Leucemia mieloide crónica; SMD: Síndrome mielodisplásico; MM: Mieloma múltiple; GMSI: Gammapatía monoclonal de significado incierto; AT/RT: tumor teratoideo/rabdoide atípico; EMR: Enfermedad mínima residual; LSCs: Células madre leucémicas; CSCs: Células madre tumorales.





Tumor	Alteración	Relevancia clínica	Referencia
LA	↑BMPRIA, IB, II	Buen pronóstico, mayor supervivencia, mejor respuesta al tratamiento, menor riesgo de recaída	<i>Dzietczenia et al. Leuk Lymphoma</i> 52 2336-41 2011
LMA	↑BMPRIA, IB, II	Mal pronóstico, favorece EMR	<i>Grcevic et al. Leuk Res</i> 27 731-8 2003
LPMA	↑BMPRIA, IB, II	Mal pronóstico, favorece EMR	<i>Grcevic et al. Leuk Res</i> 27 731-8 2003
LLC-B	↑BMPRIA, IB, II	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Dzietczenia et al. Int J Lab Hematol</i> 32 e217-21 2010
LMC	↑BMPRIB	Mal pronóstico, aumento LSCs	<i>Laperrousaz et al. Blood</i> 122 3767-77 2013
MM	↑ActRI, II	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Grcevic et al. Leuk Res</i> 34 742-51 2010
MM	↑BMPRIA, IB, II	Mal pronóstico, favorece EMR	<i>Grcevic et al. Leuk Res</i> 27 731-8 2003
Ovario	↑ActRI, BMPRIA	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Hover et al. Cancer Lett</i> 368 79-87 2015
Ovario	↑BMPRIA, IB, II	Mal pronóstico, no relacionado con clínica	<i>Shepherd and Nachtigal Endocrinology</i> 144 3306-14 2003
Pecho	↑BMPRIA, II	Mal pronóstico, no relacionado con la evolución de la enfermedad	<i>Farnsworth et al. Cancer Res</i> 71 6547-57 2011
Pecho	↑BMPRIA	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Pickup et al. Oncotarget</i> 6 22890-904 2015
Colon	↑BMPRIA, IB, II	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Slattery et al. Int J Cancer</i> 130 653-64 2012
Recto	↑BMPRIB, II	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Slattery et al. Int J Cancer</i> 130 653-64 2012
Colorrectal	↓BMPRIA	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Howe et al. Nat Genet</i> 28 184-7 2001
Glioblastoma, glioma grado IV	↓ActRIA	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Hover et al. Transl Oncogenomics</i> 7 1-9 2015
Glioma	↓ActRIA	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Taylor et al. Nat Genet</i> 46 457-61 2014
Glioma	↓ActRIA	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Buczkowicz et al. Acta Neuropathol</i> 128 573-81 2014
Glioma	↓ActRIA	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Fontebasso et al. Nat Genet</i> 46 462-6 2014
Glioma	↓BMPRIB	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Lee et al. Cancer Cell</i> 13 69-80 2008

Tumor	Alteración	Relevancia clínica	Referencia
Meduloblastoma	↑ActRIIA, IIB y TGFβRI	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Northcott et al. Nature 488 49-56 2012</i>
Condrosarcoma	↑BMPRII	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Jiao et al. Cell Death Dis 5 e1571 2014</i>
Carcinoma oral	↑BMPRIA	No relacionado con clínica	<i>Jin et al. Oral Oncol 37 225-33 2001</i>
Páncreas	↑BMPRIA, II	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Kleeff et al. Gastroenterology 116 1202-16 1999</i>
Páncreas	↑BMPRIA	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Voorneveld et al. Br J Cancer 109 1805-12 2013</i>
Páncreas	↑BMPRIA, II	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Gordon et al. Carcinogenesis 30 238-48 2009</i>
Próstata	↓BMPRI	No relacionado con clínica	<i>Ide et al. Oncogene 14 1377-82 1997</i>
Próstata	↓BMPRIA, IB, II	Mal pronóstico, mayor agresividad del tumor	<i>Kim et al. Oncogene 23 7651-9 2004</i>
Próstata	↓BMPRIA, IB, II	Mal pronóstico, mayor agresividad del tumor	<i>Kim et al. Cancer Res 60 2840-4 2000</i>
Hígado	↑BMPRIA	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Chiu et al. Mol Cancer Res 10 415-27 2012</i>
Vejiga	↓BMPRII	Mal pronóstico, mayor agresividad del tumor	<i>Kim et al. Cancer Res 64 7355-60 2004</i>

**Tabla II: Alteración en la expresión de los receptores para ligandos BMP en tumores sólidos y hematológicos.**

BMPRI: Receptor tipo I de BMP; BMPRII: Receptor tipo II de BMP; ActRI: Receptor tipo I de activina; ActRII: Receptor tipo II de activina; TGFβRI: Receptor tipo I de TGF-β; LA: Leucemia aguda; LMA: Leucemia mieloide aguda; LPMA: Leucemia promielocítica aguda; LLC-B: Leucemia linfocítica crónica tipo B; LMC: Leucemia mieloide crónica; MM: Mieloma múltiple; EMR: Enfermedad mínima residual; LSCs: Células madre leucémicas.

Tumor	Alteración	Relevancia clínica	Referencia
LMC	↓Smad1, Smad8, Id2, Id3, RUNX2	Mal pronóstico, aumento LSCs	<i>Laperrousaz et al. Blood 122 3767-77 2013</i>
Linfoma	↑Smad1	No relacionado con clínica	<i>Munoz et al. Leukemia 18 2015-25 2004</i>
Ovario	↑Smad5 nuclear	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Peng et al. Mol Carcinog 2015</i>
Colorrectal	↑BMP4, no necesario Smad4	Mal pronóstico, no correlaciona con supervivencia	<i>Deng et al. Cancer Lett 281 220-31 2009</i>
Colorrectal	↓Smad4	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Howe et al. Science 280 1086-8 1998</i>
Colorrectal	↓Smad4	Mal pronóstico, no correlaciona con supervivencia	<i>Voorneveld et al. Eur J Cancer Prev 22 420-4 2013</i>
Gástrico	↑Smad4	Buen pronóstico, mayor supervivencia	<i>Kim et al. Ann Oncol 15 574-80 2004</i>
Glioma	↑Smad1	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Hover et al. Transl Oncogenomics 7 1-9 2015</i>
Glioma	↑Id1, Id2	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Buczkowicz et al. Acta Neuropathol 128 573-81 2014</i>
Carcinoma esofágico	↑BMP6, Id1	Mal pronóstico, menor supervivencia por aumento población CSCs	<i>Yuen et al. Cancer Sci 103 1145-54 2012</i>
Carcinoma cabeza y cuello	↑BMP4, Smad1	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Xu et al. Arch Med Res 42 128-37 2011</i>
Páncreas	↓BMPRI ↑Smad4	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Voorneveld et al. Br J Cancer 109 1805-12 2013</i>

**Tabla III: Alteración en la expresión de las proteínas transductoras de la señal BMP en tumores sólidos y hematológicos.** BMPRI: Receptor tipo I de BMP; BMP: Proteína morfogenética ósea; LMC: Leucemia mieloide crónica; LSCs: Células madre leucémicas; CSCs: Células madre tumorales.



Tumor	Alteración	Relevancia clínica	Referencia
LMC	↑Smad6	Mal pronóstico, aumento LSCs	<i>Laperrousaz et al. Blood</i> 122 3767-77 2013
LMC	↑Smad7, NOG	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Gerber et al. Oncotarget</i> 4 715-28 2013
SMD	↓NOG	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Andrieux et al. Cancer Genet Cytogenet</i> 178 11-6 2007
MM	↓NOG	Mal pronóstico, favorece evolución de la enfermedad	<i>Grcevic et al. Leuk Res</i> 34 742-51 2010
Linfoma B	↑Smad7	Mal pronóstico, no relacionado con supervivencia	<i>Huse et al. PLoS One</i> 7 e46117 2012
Útero	↑GREM1	Mal pronóstico, mantenimiento población CSCs	<i>Sato et al. Oncol Rep</i> 35 391-7 2016
Colorrectal	↑BAMBI	Mal pronóstico, menor supervivencia. Mayor número de recaídas	<i>Togo et al. World J Gastroenterol</i> 14 4880-8 2008
Gástrico	↓Smad7	Buen pronóstico, mayor supervivencia	<i>Kim et al. Ann Oncol</i> 15 574-80 2004
Glioma	↑GREM1	Mal pronóstico, no relacionado con supervivencia	<i>Yan et al. Genes Dev</i> 28 1085-100 2014
Carcinoma esofágico	↓NOG	Mal pronóstico, menor supervivencia por aumento población CSCs	<i>Yuen et al. Cancer Sci</i> 103 1145-54 2012
Carcinoma	↑GREM1	Mal pronóstico, microambiente favorece desarrollo tumoral	<i>Sneddon et al. Proc Natl Acad Sci U S A</i> 103 14842-7 2006
Pulmón	↑Smad6	Mal pronóstico, menor supervivencia	<i>Jeon et al. Cancer Res</i> 68 9686-92 2008
Melanoma	↑GREM1	Mal pronóstico, microambiente favorece desarrollo tumoral	<i>Sneddon et al. Proc Natl Acad Sci U S A</i> 103 14842-7 2006
Renal	↓SOSTDC1	Mal pronóstico, promueve desarrollo tumoral	<i>Blish et al. Mol Biol Cell</i> 19 457-64 2008

**Tabla IV: Alteración en la expresión de los reguladores negativos de la señal BMP en tumores sólidos y hematológicos.** LMC: Leucemia mieloide crónica; SMD: Síndrome mielodisplásico; MM: Mieloma múltiple; LSCs: Células madre leucémicas; CSCs: Células madre tumorales.



**ANEXO II**







## Original Articles

# Mesenchymal stem cells derived from low risk acute lymphoblastic leukemia patients promote NK cell antitumor activity



Ana Entrena <sup>a</sup>, Alberto Varas <sup>a</sup>, Miriam Vázquez <sup>a</sup>, Gustavo J. Melen <sup>b</sup>,  
Lidia M. Fernández-Sevilla <sup>a</sup>, Javier García-Castro <sup>c</sup>, Manuel Ramírez <sup>b</sup>, Agustín G. Zapata <sup>d</sup>,  
Ángeles Vicente <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, School of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Oncohematology, Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Cellular Biotechnology Unit, Institute for Health Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 16 January 2015

Received in revised form 30 March 2015

Accepted 10 April 2015

## Keywords:

Mesenchymal stem cells

Acute lymphoblastic leukemia

NK cells

Tumor microenvironment

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are key components of the bone marrow microenvironment which contribute to the maintenance of the hematopoietic stem cell niche and exert immunoregulatory functions in innate and adaptive immunity. We analyze the immunobiology of MSCs derived from acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients and their impact on NK cell function. In contrast to the inhibitory effects on the immune response exerted by MSCs from healthy donors (Healthy-MSCs), we demonstrate that MSCs derived from low/intermediate risk ALL patients at diagnosis (ALL-MSCs) promote an efficient NK cell response including cytokine production, phenotypic activation and most importantly, cytotoxicity. Longitudinal studies indicate that these immunostimulatory effects of ALL-MSCs are progressively attenuated. Healthy-MSCs adopt ALL-MSC-like immunomodulatory features when exposed to leukemia cells, acquiring the ability to stimulate NK cell antitumor function. The mechanisms underlying to these functional changes of ALL-MSCs include reduced production of soluble inhibitory factors, differential expression of costimulatory and coinhibitory molecules, increased expression of specific TLRs and Notch pathway activation. Collectively our findings indicate that, in response to leukemia cells, ALL-MSCs could mediate a host beneficial immunomodulatory effect by stimulating the antitumor innate immune response.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Different studies have emphasized the relevance of bone marrow microenvironment components in the development and maintenance of hematological malignant disease as facilitators of tumor development [1–5]. One of the key components of the marrow microenvironment are mesenchymal stem cells (MSCs). MSCs isolated from healthy donors can suppress immune responses affecting a broad range of cells, including T and B lymphocytes, natural killer (NK) cells and dendritic cells (DCs) [6,7]. Therefore, the traditional

view is that the suppression of immune responses by MSCs could facilitate tissue remodeling, repair and control of autoimmune disorders, but would be detrimental for other disease processes such as cancer. However, in this scenario it is necessary to include recent studies suggesting that MSCs possess the dual ability to suppress and also activate the immune system depending on the stimulus. These results suggest that MSCs, like macrophages, can be polarized following specific TLR priming in MSC1, or cells that mostly produce pro-inflammatory mediators, and MSC2 that express mostly immunosuppressive factors [8].

Distinct studies have reported differences in the phenotype, proliferation and differentiation ability, cytokine production or immunomodulatory activity between MSCs isolated from patients with different hematopoietic disorders and healthy donors [5,9–12]. In most cases, these alterations have been suggested to somehow contribute to the pathogenesis of the disease and/or occurrence of relapse; however the progress in this area has been hampered by the inability to propagate human disease in murine xenograft models [13] except a recently published study for myelodysplastic syndromes [5]. Regarding immunomodulatory functions of patient MSCs, the results are very scarce and mainly related

**Abbreviations:** ALL, acute lymphoblastic leukemia; ALL-MSCs, MSCs derived from low/intermediate risk ALL patients at diagnosis; ALL-MSCs+15, MSCs derived from low/intermediate risk ALL patients at 15 days after initiation of therapy; ALL-MSCs+35, MSCs derived from low/intermediate risk ALL patients at 35 days after initiation of therapy; DC, dendritic cells; Healthy-MSCs, MSCs from healthy donors; MSCs, mesenchymal stem cells; NK, natural killer cells; OOT-MSCs, MSCs derived from ALL patients without signs of disease and out of therapy; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 71 66; fax: +34 91 394 13 96.

E-mail address: [avicente@ucm.es](mailto:avicente@ucm.es) (Á. Vicente).

# Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

## Optimal Effector Functions in Human Natural Killer Cells Rely upon Autocrine Bone Morphogenetic Protein Signaling

Neil C. Robson, Laura Hidalgo, Tristan McAlpine, et al.

*Cancer Res* 2014;74:5019-5031. Published OnlineFirst July 18, 2014.

<b>Updated version</b>	Access the most recent version of this article at: doi: <a href="https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2845">10.1158/0008-5472.CAN-13-2845</a>
<b>Supplementary Material</b>	Access the most recent supplemental material at: <a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2014/07/23/0008-5472.CAN-13-2845.DC1.html">http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2014/07/23/0008-5472.CAN-13-2845.DC1.html</a>

<b>Cited articles</b>	This article cites 50 articles, 21 of which you can access for free at: <a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/18/5019.full.html#ref-list-1">http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/18/5019.full.html#ref-list-1</a>
-----------------------	--

<b>E-mail alerts</b>	<a href="#">Sign up to receive free email-alerts</a> related to this article or journal.
<b>Reprints and Subscriptions</b>	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at <a href="mailto:pubs@aacr.org">pubs@aacr.org</a> .
<b>Permissions</b>	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at <a href="mailto:permissions@aacr.org">permissions@aacr.org</a> .

## Optimal Effector Functions in Human Natural Killer Cells Rely upon Autocrine Bone Morphogenetic Protein Signaling

Neil C. Robson<sup>1</sup>, Laura Hidalgo<sup>2</sup>, Tristan McAlpine<sup>3</sup>, Heng Wei<sup>3</sup>, Víctor G. Martínez<sup>2</sup>, Ana Entrena<sup>2</sup>, Gustavo J. Melen<sup>4</sup>, Andrew S. MacDonald<sup>5</sup>, Alexander Phythian-Adams<sup>5</sup>, Rosa Sacedón<sup>2</sup>, Eugene Maraskovsky<sup>6</sup>, Jonathan Cebon<sup>3</sup>, Manuel Ramírez<sup>4</sup>, Angeles Vicente<sup>2</sup>, and Alberto Varas<sup>2</sup>

### Abstract

Natural killer (NK) cells are critical for innate tumor immunity due to their specialized ability to recognize and kill neoplastically transformed cells. However, NK cells require a specific set of cytokine-mediated signals to achieve optimal effector function. Th1-associated cytokines promote effector functions that are inhibited by the prototypic Th2 cytokine IL4 and the TGF $\beta$  superfamily members TGF $\beta$ 1 and activin-A. Interestingly, the largest subgroup of the TGF $\beta$  superfamily are the bone morphogenetic proteins (BMP), but the effects of BMP signaling on NK cell effector functions have not been evaluated. Here, we demonstrate that blood-circulating NK cells express type I and II BMP receptors, BMP-2 and BMP-6 ligands, and phosphorylated isoforms of Smad-1/-5/-8, which mediate BMP family member signaling. In opposition to the inhibitory effects of TGF $\beta$ 1 or activin-A, autocrine BMP signaling was supportive to NK cell function. Mechanistic investigations in cytokine and TLR-L-activated NK cells revealed that BMP signaling optimized IFN $\gamma$  and global cytokine and chemokine production, phenotypic activation and proliferation, and autologous dendritic cell activation and target cytotoxicity. Collectively, our findings identify a novel auto-activatory pathway that is essential for optimal NK cell effector function, one that might be therapeutically manipulated to help eradicate tumors. *Cancer Res*; 74(18); 5019–31. ©2014 AACR.

### Introduction

Natural killer (NK) cells are circulating innate immune sentinels specialized to recognize and kill tumor and virus-infected cells (1). Consisting typically of 2% to 5% of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), NK cells represent a significant component of the human immune repertoire. Historically, human NK cells have been subdivided into at least two subgroups based on their expression of CD16 and CD56 (2). CD56 intermediate<sup>(int)</sup>/CD16<sup>+</sup> NK cells are credited with more immediate cytotoxic capability, whereas the numerically smaller (in blood) CD56 hi<sup>(hi)</sup>/CD16<sup>–</sup> subset is associated with more rapid IFN $\gamma$  release and proliferation upon activation (3, 4). This early

IFN $\gamma$  production can act in an autocrine fashion to stimulate NK cells' own effector functions and can also significantly enhance important dendritic cell (DC) functions such as tumor antigen processing, presentation, and cross-presentation for the priming of tumor antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Nevertheless, uncontrolled proliferation and/or release of NK cell inflammatory cytokines can result in pathology or cellular transformation (5, 6). Thus, the immune system has coordinately developed mechanisms to avoid these potentially life-threatening events through the release of inflammatory mediators (7).

With relation to NK cells, their effector functions are best known to be negatively regulated via engagement of inhibitory receptors with MHC class I proteins or by suppressive cytokines such as IL4 or TGF $\beta$ 1 (8–10). Although it has been known for some time that exogenous TGF $\beta$ 1 can suppress NK cells IFN $\gamma$  production, it is only relatively recently that activin-A (a further TGF $\beta$  superfamily member) has also been described to be inhibitory (11). Considering the TGF $\beta$  superfamily consists of more than 30 members, our understanding of how members other than TGF $\beta$ 1 and activin-A may potentially influence NK cells' effector functions is very poor. Interestingly, the largest subset of the TGF $\beta$  superfamily are the BMPs, yet aside from our recent report demonstrating a role for autocrine BMP signaling in human thymic NK cell development (12), the literature is yet to describe the consequences of BMP signaling to NK cells' effector functions.

The BMPs signal via type I and II serine/threonine kinase receptor heterodimers in complex with the bound ligand. Three type I receptors have been shown to bind BMP ligands, i.e., BMPRIA (or ALK-3), BMPRII (or ALK-6), and the activin

<sup>1</sup>Institute of Infection, Immunity and Inflammation, The University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom. <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Ludwig Institute for Cancer Research, Austin Health, Heidelberg, Victoria, Australia. <sup>4</sup>Department of Oncohematology, Niño Jesús Hospital, Madrid, Spain. <sup>5</sup>MCCIR, Core Technology Facility, The University of Manchester, Manchester, United Kingdom. <sup>6</sup>CSL Limited, Parkville, Melbourne, Victoria, Australia.

N.C. Robson, L. Hidalgo, A. Vicente, and A. Varas contributed equally to this article.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

**Corresponding Authors:** Neil C. Robson, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, Sir Graeme Davis Building, 120 University Place, The University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom. Phone: 44-141-330-2282; Fax: 44-141-330-4297; E-mail: [neil.robson@ed.ac.uk](mailto:neil.robson@ed.ac.uk); and Alberto Varas, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; E-mail: [avaras@bio.ucm.es](mailto:avaras@bio.ucm.es)

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2845

©2014 American Association for Cancer Research.

receptor ActRIA (or ALK-2). There are also three type II receptors termed BMPRII, ActRIIA, and ActRIIB. Whereas BMPRIA, BMPRII, and BMPRII specifically bind BMPs, ActRIA, ActRIIA, and ActRIIB are also receptors for the activins (13). Activated receptors relay signals to the nucleus predominantly via the canonical Smad-dependant pathway (although noncanonical Smad-independent pathways exist, e.g., p38 MAPK; ref. 14) where phosphorylated (p)-Smads-1/-5/-8 complex with co-Smad-4 and translocate into the nucleus to trigger target gene expression (14, 15).

As their name suggests, the BMPs' originally defined biological function was the capacity to induce bone formation (16). However, the biological actions of the BMPs are now known to be diverse with critical roles in numerous developmental processes (17–21). Indeed, specific BMPs influence the formation of disparate tissues in mammals such as skin, eyes, teeth, heart, kidneys, and testes and dysregulated signaling can result in major muscular and skeletal abnormalities (22–28). These diverse functions are accounted for in part by (i) their significant number; (ii) the existence of numerous antagonists; (iii) their complex interactions with other TGF $\beta$  superfamily members; (iv) their promiscuous receptor usage; (v) the presence of corepressors and activators; and (vi) the existence of multiple inhibitors of signaling such as the pseudoreceptor BAMBI, Smads-6 and -7, and the HECT-type E3 ligases Smurf 1 and 2 (13, 29–38).

The BMPs (as with the TGF $\beta$ s and activins) are pleiotropic in nature and can both inhibit or promote tumorigenesis. Indeed, BMP signaling can have prometastatic effects on breast cancer cells (39) and antagonism of BMP type I receptors has been reported to decrease growth and induce cell death of lung cancer cell lines (40). In contrast, BMP-2 signaling has been demonstrated to inhibit the development of colon cancers (41), whereas BMP-4 can potentially inhibit the tumor-initiating capacity of human glioblastoma precursors (42). Strikingly, this study also demonstrated that prophylactic or therapeutic *in vivo* delivery of BMP-4 dramatically reduced mortality in mice following intracerebral grafting of human glioblastoma cells.

Given that TGF $\beta$ 1 and activin-A are potent negative regulators of NK cells' effector functions, we hypothesized that BMP signaling may also have important consequences. Our studies demonstrate that NK cells express cell surface and intracellular stores of BMP receptors, mRNAs for BMP-2 and -6, and p-Smads-1/-5/-8. In sharp contrast with the suppressive effects of TGF $\beta$ 1 or activin-A (11), inhibition of autocrine BMP signaling in NK cells reveals a novel autocrine activatory pathway that confers optimal IFN $\gamma$  production, global cytokine and chemokine production, phenotypic maturation, proliferation, autologous DC activation, and most importantly cytotoxicity. Furthermore, we have also identified that NK cells resident in the bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) at high risk of relapse display significantly reduced levels of the high-affinity type I BMPR receptor, BMPRIA, and this correlates with a phenotype indicative of a reduced activatory state.

These data have important implications for the development of new methods aimed to enhance NK cells' capacity to kill tumors directly *in vivo* or potentially to enhance NK cells' effector functions before adoptive immune therapy into patients with cancer.

## Materials and Methods

### Cell culture

PBMCs from buffy coats of healthy donors (Red Cross Blood Bank, Melbourne, Australia and Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, Spain) were prepared by Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences) density-gradient centrifugation. NK cells were isolated by negative selection using a NK cell Isolation Kit and MACS (Miltenyi Biotech). In some cases, NK cells were further purified by FACS (MoFlow; Beckman Coulter). Unless otherwise stated, culture media consisted of RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 20 mmol/L HEPES, 60 mg/L penicillin, 12.5 mg/L streptomycin, and 2 mmol/L L-glutamine. NK cells were maintained in culture media alone or culture media supplemented with IL2 at 20 to 50 ng/mL with or without the addition of 10 ng/mL IL12 together with 10  $\mu$ g/mL of poly I:C (InvivoGen). In some cases, NK cells were cultured in 20 to 50 ng/mL IL15 alone. CD1c<sup>+</sup> myeloid DCs, CD14<sup>+</sup> monocytes, and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were isolated by positive selection by MACS. To generate monocyte-derived DCs (MoDC), CD14<sup>+</sup> monocytes were cultured in culture media containing 10% FCS, 20 ng/mL GM-CSF, and 20 ng/mL IL4 (Invitrogen) for 6 to 7 days. For NK cell and DC cocultures, autologous NK cells and CD1c<sup>+</sup> MoDCs were cocultured at a DC:NK cell ratio of 1:1 or 1:5, respectively, for 24 hours. For the experiments shown in Fig. 5, NK cells were treated under the conditions shown for 12 hours then extensively washed before coculture with autologous MoDCs. To assess the effects of blocking BMP signaling, compound C/dorsomorphin, an inhibitor of BMPRIA, BMPRII, ActRIA, and AMPK, or the highly selective BMPRIA and ActRIA inhibitor DMH1 (both TOCRIS Bioscience), or recombinant human noggin (R&D Systems) was added to NK cell cultures for 12 to 24 hours in the absence or presence of IL2 with or without the addition of IL12 and poly I:C.

### Quantitative real-time polymerase chain reaction

RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and cDNA synthesized. Gene expression was quantified using a Stratagene Mx3005P machine. Primers were designed for the detection of BMPRIA, IB, RII, BMP-2, -4, -6, and -7 and used with probes from a Universal ProbeLibrary (Roche Applied Science). Pre-Developed TaqMan Assay Reagents were obtained from Applied Biosystems and included Smad-1 (Hs00195432\_m1), Smad-3 (Hs00969210\_m1), Smad-7 (Hs00998193\_m1), BAMBI (Hs00180818\_m1), and TGF $\beta$ 1 (Hs00998133\_m1). 18S rRNA and GNB2L1 were used for normalization. PCR reactions were set up in 96-well plates and analyzed using SDS program version v1.9. The frequency of target gene expression was calculated using the formula  $(1 + E_{\text{norm}})^{Ct_{\text{norm}}} / (1 + E_{\text{GOI}})^{Ct_{\text{GOI}}}$ , where "E" = efficiency. Otherwise, the relative expression was calculated using  $2^{(Ct_{18S} - Ct_{\text{target gene}})}$ . Relative expression was then calculated using the  $\Delta C_t$  method and expressed relative to a calibrator, i.e., *ex vivo* purified NK cells or relevant NK cell control cultures.

### Flow cytometry

NK cells or MoDCs were costained with combinations of fluorochrome-labeled antibodies against human CD1c, CD3, CD14, CD16, CD56, CD69, CD80, CD83, CD94, LAMP1/CD107a, BMPRIA, BMPRII, BMPRII, NKp30, NKp46, KIR2DL2/L3,



NKG2A, and D (BD Biosciences, BioLegend, and R&D Systems). Intracellular staining was performed using anti-human BMPRIA (R&D Systems) and anti-human p-Smad-1/-5/-8 antibodies (Ser463/Ser465; Santa Cruz Biotechnology). The proportion of apoptotic NK cells was determined by Annexin V (BioLegend) staining and flow cytometry and the data were analyzed using the FlowJo software (version 3.4).

#### Assessment of NK cell proliferation

Purified NK cells were labeled with 1  $\mu\text{mol/L}$  CFSE (Molecular Probes) at 37°C for 10 minutes. After washing, the cells were cultured in IL2 or IL15 alone or IL2 in combination with IL12 and poly I:C with or without the addition of 100 ng/mL of noggin or 20  $\mu\text{mol/L}$  DMH1 for 5 or 6 days.

#### Cytokine ELISA and multiplex cytokine and chemokine arrays

Cytokine ELISA kits were used to quantify IFN $\gamma$ , IL12p70 and TNF $\alpha$  (BD Biosciences and BioLegend). Cytokine and chemokine bead arrays (LINCOplex) were used to quantify IFN $\gamma$ , IL6, -10, -13, TNF $\alpha$ , GM-CSF, CXCL8, CXCL10, CCL3, and CCL4 and samples analyzed on a Luminex instrument (all Millipore). IL6, -10, GM-CSF, CCL5, CXCL10, and CCL2 were also measured using a Cytometric Bead Array Flex Set system (BD Biosciences).

#### Assessment of NK cell cytotoxicity

Purified NK cells were cultured overnight in media containing IL2 alone or IL2 together with IL12 and poly I:C in the absence or presence of increasing concentrations of DMH1 before being washed and then cocultured with the erythroleukemic K562 target cell line in 96-well plates for 4 hours at the effector-to-target ratios indicated. In some cases, DMH1 was added during the 4-hour cytotoxicity assay. Specific lysis was determined using a nonradioactive Cytotoxicity Detection Kit (LDH; Roche Diagnostics) by measuring lactate dehydrogenase activity in culture supernatants. In some experiments, LAMP-1/CD107a expression by NK cells was assessed by flow cytometry after 4 hours of culture at an NK cell/K562 ratio of 10:1.

#### Bone marrow samples

Samples were obtained from bone marrow aspirates at diagnosis ( $n = 12$ ) or at relapse ( $n = 5$ ) from children with ALL at Hospital Niño Jesús (Madrid, Spain). Patients were treated under the PETHEMA protocol (43). The patients were classified according to this protocol into high risk ( $n = 5$ ) or low-/intermediate risk ( $n = 7$ ). Expression levels of different surface markers on NK cells were determined by multiparameter flow cytometry on bone marrow samples. A CD45-positive CD3-negative CD56-positive gate was used for each sample to analyze the NK cell population. Samples were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software.

#### Statistical analysis

Unless indicated, results are expressed as the mean  $\pm$  SD of 3 or more donors. Data were analyzed using the Student  $t$  test, and  $P < 0.01$  (\*) was considered significant.

## Results

### BMP receptor and ligand gene expression in human NK cells

To assess the relevance of BMP signaling to NK cells, we first investigated BMP receptor and ligand expression at the mRNA level. To do this, we highly purified NK cells (Fig. 1A) and autologous CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  T cells from human blood and analyzed the expression of mRNAs for BMP-2, -4, -6, and -7 ligands and the BMP type I (BMPRIA and BMPRIB) and type II (BMPRII) receptors by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). We found that NK cells exclusively expressed BMP-2 but that each cell type commonly expressed BMP-6 message (Fig. 1B). Furthermore, although highly expressed on skeletal muscle controls (not shown), BMP-4 and -7 mRNAs were absent from each of the lymphocyte populations tested (Fig. 1B). The analysis further demonstrated that BMPRIA and BMPRII mRNAs are expressed by each of these lymphocyte populations but that NK cells expressed significantly higher levels of BMPRII mRNA than either CD4 $^{+}$  or CD8 $^{+}$  T cells (Fig. 1C). Interestingly, BMPRIB expression was absent from each cell type, suggesting that NK cells and CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  T cells are likely to use a BMPRIA–BMPRII receptor pair for BMP ligand binding and signal transduction.

Finally, NK cells express TLR-3, and the TLR-3 ligand poly I:C is currently being evaluated in experimental clinical settings to enhance NK cell-mediated immunity against cancers. Furthermore, we previously have found that the addition of poly I:C to IL2- and IL12-stimulated NK cells significantly enhances their proinflammatory cytokine and chemokine production, proliferation and killing functions (11). We therefore tested whether a brief exposure to IL2 alone or IL2 in combination with IL12, with or without addition of poly I:C could influence NK cells' mRNA expression of BMP ligands. We found that the expression of BMP-6 mRNAs by NK cells was unaffected by the addition of cytokines or poly I:C, but culture in a low concentration of IL2 (20 ng/mL) was sufficient to induce upregulated BMP-2 mRNA expression (Fig. 1D). Interestingly, the addition of IL12 to NK cell cultures did not synergize with IL2 to enhance BMP-2 expression, but the addition of poly I:C increased BMP-2 mRNA levels significantly above that induced by IL2 alone (Fig. 1D). BMP-4 or BMP-7 mRNA expression, however, was not induced under any of the conditions tested. Furthermore, NK cells cultured in IL2, IL12, and poly I:C significantly upregulated mRNA for BMPRIA and BMP signaling-specific Smad-1, but conversely, simultaneously down-regulated mRNA for inhibitory Smad-7, TGF $\beta$ 1, Smad-3, and BAMBI (Supplementary Fig. S1).

To better understand the relationship between NK cells' BMP receptor mRNA expression and cell surface receptor expression, we screened purified NK cells by flow cytometry for BMPRIA and BMPRII expression at the protein level *ex vivo* and after exposure to cytokines with or without addition of poly I:C. Immediately following purification from blood, NK cells' BMPRIA expression ranged between donors from barely detectable (Fig. 2A) to low expression (Fig. 2D). Culture in IL2 induced some upregulation of BMPRIA on NK cells, but this was unaffected by the further addition of IL12

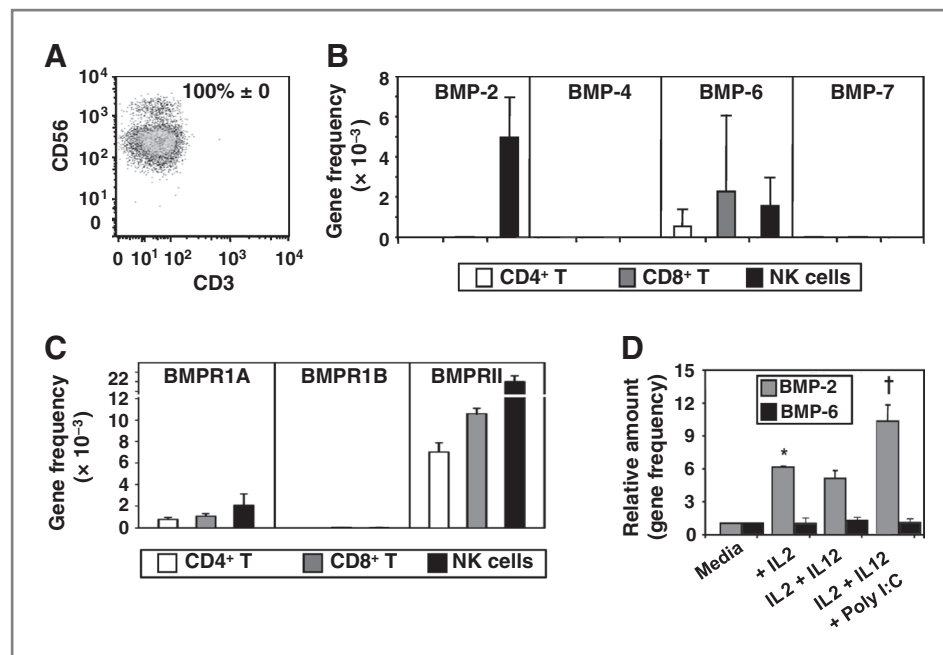


Figure 1. NK cells express mRNAs for BMP receptors and ligands. A–C, NK cells and autologous CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were purified from buffy coats of healthy donors by MACS separation and FACS cell sorting. Highly purified (>99%) CD56<sup>+</sup> CD3<sup>−</sup> cells were then lysed and assessed for expression of BMP-2, -4, -6, and -7 ligands (B) and BMPRI1A, IB, and BMPRII (C) by qRT-PCR. D, NK cells were purified by MACS (purity typically >95%) from three donors, then lysed after 4 hours of culture in media without cytokines or in culture media supplemented with IL2 alone, or with IL2 and IL12 with or without the addition of poly I:C. RNA was then extracted and qRT-PCR performed. RNA isolated from skeletal muscle served as positive controls (data not shown). Data are shown as the mean ± SD of three separate donors. \*,  $P < 0.01$  versus media only and †,  $P < 0.01$  versus media only, IL2 alone, or IL2 with IL12.

and poly I:C over the 20-hour culture period (Fig. 2A). These NK cells did however significantly upregulate their expression of the activation marker CD69 when exposed to IL12 and poly I:C (not shown). BMPRII expression differed and was relatively abundant on CD56<sup>hi</sup> NK cells with levels approaching 50% for some donors (Fig. 2B). As with NK cells' BMPRI1A expression, culture in IL2, IL12, and poly I:C had no significant impact on their expression of BMPRII (Fig. 2B).

NK cells' interactions with DCs or target cells can significantly influence their phenotype. To test if this was the case for NK cells' expression of BMP receptors, we cocultured NK cells with activated autologous CD1c<sup>+</sup> myeloid DCs or with K562 target cells and measured BMP receptor expression by flow cytometry. The results demonstrated that neither of these stimulatory conditions had any effect on NK cells' expression of either BMPRI1A or BMPRII (not shown). Thus, stimuli typically associated with the induction of NK cell activation did not affect NK cells' BMP receptor expression.

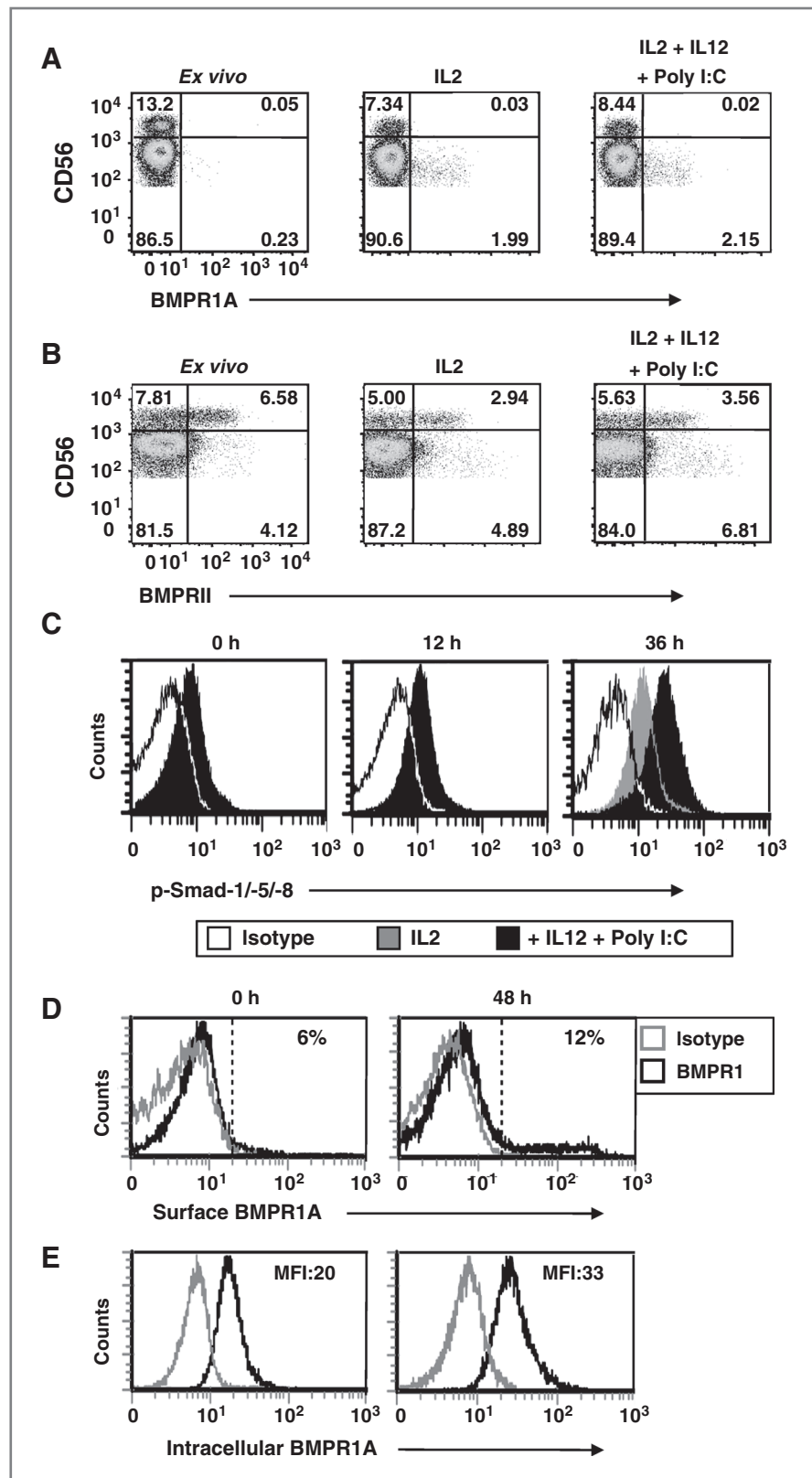
To confirm the mRNA and protein expression of BMP receptors and ligands' facilitated autocrine BMP signaling, we next measured the NK cells' intracellular p-Smad-1/-5/-8 levels by flow cytometry. Immediately after isolation, a significant proportion of NK cells stained p-Smad-1/-5/-8 positive, and these levels increased through culture in IL2 alone and further increased through addition of IL12 and poly I:C (Fig. 2C). Although these results are in agreement with those showing increased expression of mRNAs encoding BMPRI1A and Smad-1 by NK cells cultured under the same conditions (Supplemen-

tary Fig. S1), they were not fully reconcilable with our data showing more limited cell surface expression of BMPRI1A and differential expression of BMPRII, i.e. between CD56<sup>int</sup> and CD56<sup>hi</sup> NK cells (Fig. 2A and B). To understand this more fully, we explored the possibility that NK cells may have an alternative mechanism to facilitate BMP signaling. Others have shown in transfected cell lines that BMPRI1A can be present intracellularly, and to test if this was relevant to NK cells, we compared cell surface and intracellular BMPRI1A staining immediately after isolation and following culture in IL2, IL12, and poly I:C. Consistent with our previous data (see Fig. 2A), BMPRI1A was upregulated on the surface of a minority (range 2%–15%) of NK cells after stimulation (Fig. 2D). However, in complete contrast with this, the intracellular staining revealed that the majority of NK cells stained BMPRI1A positive *ex vivo* and that these levels increased upon *in vitro* stimulation with IL2, IL12, and poly I:C (Fig. 2E). The analysis also demonstrated that both the CD56<sup>int</sup> and CD56<sup>hi</sup> NK cell subsets each expressed similar levels of intracellular BMPRI1A *ex vivo* and that each subset increased their expression of intracellular BMPRI1A and p-Smads-1/-5/-8 upon stimulation with IL2, IL12, and poly I:C (Supplementary Fig. S2A and S2B).

#### Autocrine BMP signaling confers optimal NK cell effector functions

To address our hypothesis that BMP signaling in NK cells may alter their effector functions, we first used compound C/dorsomorphin, a chemical known to inhibit BMP signaling by binding to BMPRI1A, BMPRI1B, and ActRI1A (44). In summary,

**Figure 2.** NK cells express BMPRIA and BMPRII on their surface. MACS-purified NK cells (purity  $\geq 95\%$ ) were stained with monoclonal antibodies against CD3, CD56, BMPRIA, BMPRII, or p-Smads-1/-5/-8 either immediately after purification or after 12 to 48 hours of culture in 96-well plates at  $1 \times 10^5$  cells per well in media supplemented with IL2 with or without the addition of IL12 and poly I:C. The dot plots show CD56<sup>int</sup> and CD56<sup>hi</sup> CD3<sup>+</sup> NK cells with the exclusion of a small (<5%) population of CD56<sup>+</sup> cells. NK cells' surface expression of BMPRIA is shown in A and D, intracellular BMPRIA expression in E, BMPRII expression in B, and intracellular p-Smads-1/-5/-8 expression in C. Data are representative of three to six donors.

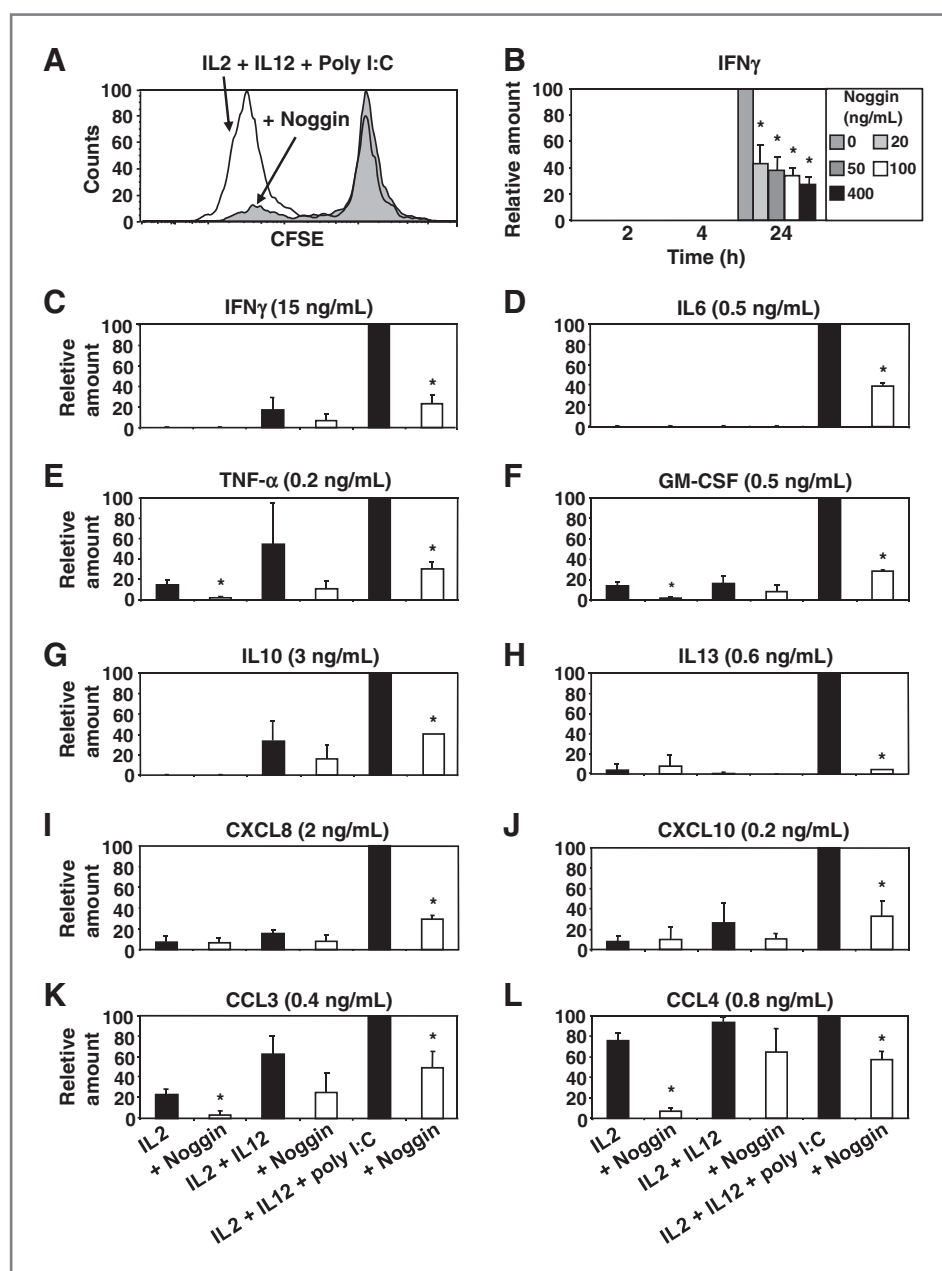




the addition of compound C/dorsomorphin to IL2- and IL12-stimulated NK cells resulted in their reduced expression of NKG2D, and in a dose-dependent manner, inhibition of IFN $\gamma$  release (Supplementary Fig. S3A and S3B). Furthermore, the addition of compound C/dorsomorphin to IL2-, IL12-, and poly I:C-stimulated NK cells resulted in the near complete inhibition of their capacity to kill K562 target cells (Supplementary Fig. S3C).

Given the potentially confounding effects of compound C/dorsomorphin on other kinases, we reassessed our findings by using the well-documented natural BMP antagonist, noggin (45). We first assessed the effects of the addition of noggin on NK cells' proliferation, as this is an important mechanism to

amplify antitumor defenses. To do this, we CFSE labeled NK cells and cultured them for 5 days in IL2, IL12, and poly I:C, with or without noggin. The results demonstrate that this stimulatory combination of cytokines, together with a TLR-3 agonist, was effective at inducing NK cell proliferation (especially in the CD56<sup>hi</sup> subpopulation; data not shown) but most importantly, inhibition of BMP signaling via the addition of noggin significantly inhibited the proliferation globally (Fig. 3A). Furthermore, in agreement with our findings using dorsomorphin/compound C (Supplementary Fig. S3B), the addition of noggin (even at low concentrations) significantly inhibited IFN $\gamma$  release by IL2-, IL12-, and poly I:C-stimulated NK cells (Fig. 3B). To extend our analysis, additional donor NK cells were



**Figure 3.** The natural BMP antagonist noggin inhibits NK cells' proliferation and cytokine and chemokine production. A, MACS-purified NK cells (purity  $\geq 95\%$ ) were CFSE labeled, then cultured at  $2 \times 10^5$  cells per well in 96-well round-bottomed plates in media supplemented with IL2, IL12, and poly I:C in the absence or presence of noggin (100 ng/mL) for 5 days. NK cells' proliferation was assessed through dilution of CFSE intensity by flow cytometry. B, purified NK cells were cultured at  $1 \times 10^5$  cells per well in 96-well round-bottomed plates in media supplemented with IL2, IL12, and poly I:C with or without the indicated concentrations of noggin for 2 to 24 hours and IFN $\gamma$  levels in the NK cells' supernatants were measured by ELISA. C–L, purified NK cells were cultured in IL2 alone with or without addition of IL12 or poly I:C or noggin (100 ng/mL) for 20 hours and the indicated cytokines and chemokines were measured by Luminex. One representative donor of three is shown in A, whereas in B–L, the data are the mean  $\pm$  SD of three separate donors. \*,  $P < 0.01$  versus IL2-, IL12-, and poly I:C-activated NK cells without addition of noggin.

cultured in IL2 alone or together with IL12 with or without the addition of poly I:C or noggin before the supernatants were interrogated for cytokine and chemokine content by Luminex. First, the results demonstrate that the addition of poly I:C (together with IL2 and IL12) induced significant increases in NK cells' release of the majority of cytokines and chemokines tested, i.e., above that induced by IL2 and IL12 stimulation alone (Fig. 3 C–L). This method confirmed and extended our ELISA data by again demonstrating that inhibition of autocrine BMP signaling through the addition of noggin to IL2-, IL12-, and poly I:C-activated NK cells significantly inhibited their IFN $\gamma$  production (Fig. 3C), but also revealed that the addition of noggin suppressed NK cells' production of Th1-associated IL6, TNF $\alpha$ , and GM-CSF (Fig. 3D–F), Th2-associated IL10 and IL13 (Fig. 3G and H), and the chemokines CXCL8, CXCL10, CCL3, and CCL4 (Fig. 3I–L).

Noggin neutralizes a number of BMPs (including BMP-2, -4, -5, -6, and -7), but its binding affinity varies, e.g., very high affinity for BMP-2 but moderate affinity for BMP-7. Therefore, to further substantiate our findings, we modified our experimental method by incorporating the use of DMH1, a second-generation compound C/dorsomorphin homolog known to be a highly specific inhibitor of BMPRIA (and also ActRIA). We first tested whether the addition of DMH1 to IL2-, IL12-, and poly I:C-stimulated NK cells resulted in altered p-Smad-1/-5/-8 expression. The results demonstrate that stimulation with IL2, IL12, and poly I:C increased p-Smad-1/-5/-8 levels in NK cells above that expressed by NK cells cultured in media alone, but most importantly, the addition of DMH1 effectively inhibited p-Smad-1/-5/-8 induction in each instance (Fig. 4A).

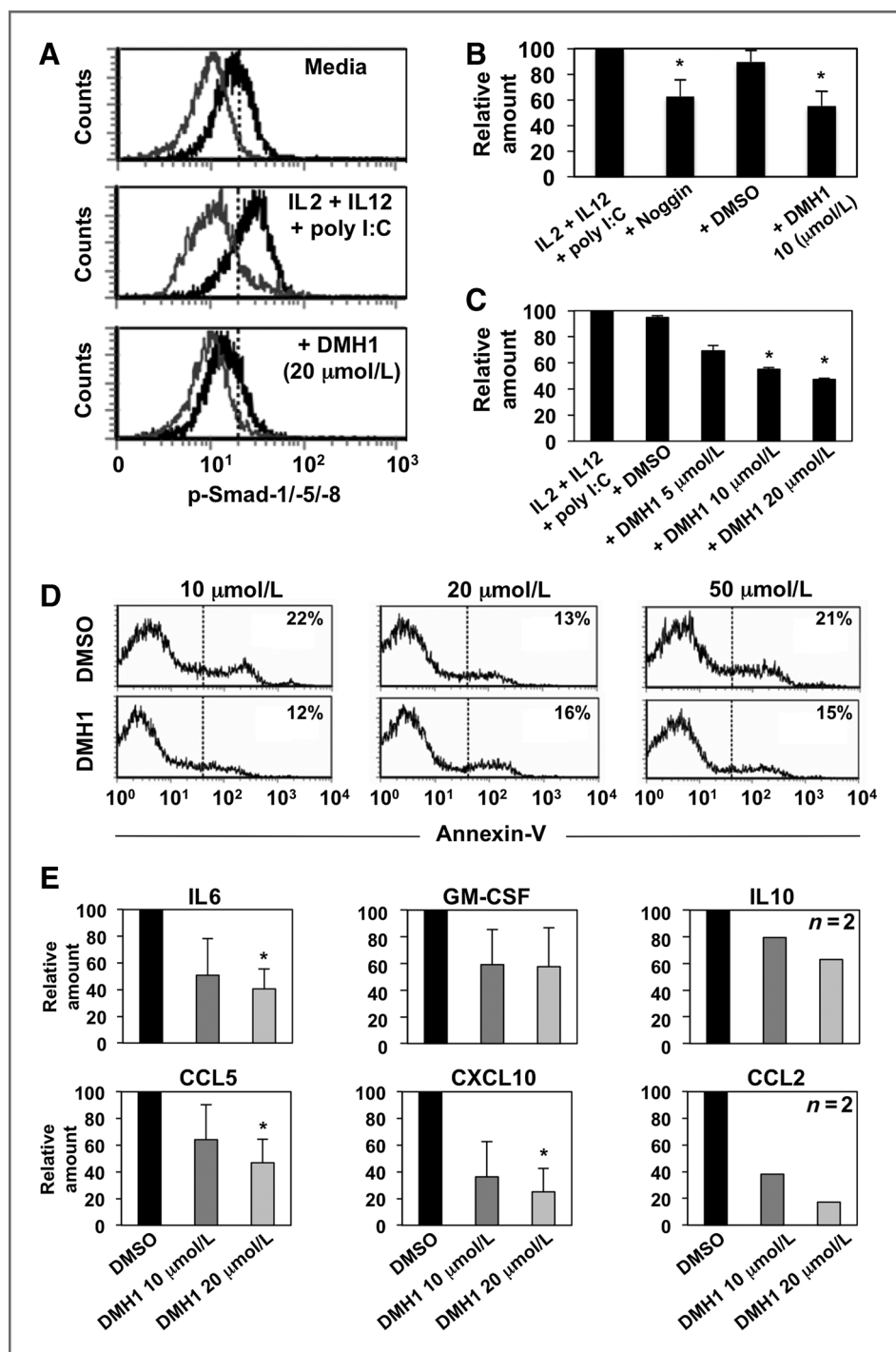
Next, to test whether inhibition of NK cells' BMP signaling via DMH1 supported our findings using noggin, we compared the two reagents side by side. The results demonstrated that addition of DMH1 to IL2-, IL12-, and poly I:C-stimulated NK cells inhibited their IFN $\gamma$  release, and importantly, this was comparable with the inhibition induced by noggin (Fig. 4B), was dose dependent (Fig. 4C), and was not superficially due to inhibitor toxicity (Fig. 4D). Intracellular IFN $\gamma$  staining also revealed that both CD56<sup>int</sup> and CD56<sup>hi</sup> NK subsets contained IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells upon stimulation with IL2, IL12, and poly I:C, and that the proportion of each diminished upon DMH1 treatment (Supplementary Fig. S4A). Also, similar to noggin's inhibitory effects on NK cell proliferation, blocking autocrine BMP signaling through the addition of DMH1 to either IL2- or IL15-stimulated NK cells also resulted in inhibition of proliferation (Supplementary Fig. S4B and S4C). Finally, further analysis also confirmed that addition of DMH1 to IL2-, IL12-, and poly I:C-stimulated NK cells resulted in a very similar pattern of cytokine (IL6, IL10, and GM-CSF) and chemokine (CCL5, CXCL10, and CCL2) inhibition as that induced by BMP neutralization through addition of noggin (compare Fig. 3C–L with Fig. 4E). Thus, inhibition of BMP signaling through addition of a naturally occurring antagonist or prevention of BMP signaling through chemically mediated receptor blockade each resulted in a decreased capacity of NK cells to produce inflammatory cytokines and chemokines. Given that each method of BMP signaling inhibition resulted in the same

functional outcome, and taking into consideration that small-molecule inhibitors have several advantages over their endogenous counterparts (including lower cost and more consistent activity), we concluded our studies using DMH1.

As mentioned previously, the importance of bidirectional communication between NK cells and DCs for Th1-mediated antitumor immunity is well documented. Therefore, we wished to identify if inhibition of BMP signaling in NK cells resulted in their altered capacity to activate autologous DCs. To do this, we cultured NK cells in the presence or absence of IL2, IL12, and poly I:C with or without the addition of DMH1 for 12 hours before the NK cells were washed thoroughly and then cocultured with autologous MoDCs. After 24 hours, we then assessed the phenotype of the MoDCs and measured cytokine production. In agreement with the literature, activated NK cells had an enhanced capacity to induce CD80 and CD83 expression by MoDCs, but importantly, DMH1-treated NK cells were compromised in this regard (Fig. 5A). In line with these findings, DMH1-treated IL2, IL12 and poly I:C activated NK cells completely failed to induce IL12p70 production by MoDC, and DMH1 treatment inhibited global TNF $\alpha$  production (Fig. 5B). Taken together, these results show that the auto-activatory effects of BMP signaling in NK cells are important not only for their own capacity to produce inflammatory cytokines and chemokines but also for their paracrine capacity to activate DCs.

The engagement of activatory and inhibitory receptors allows NK cells to discriminate between healthy cells and those requiring execution. Therefore, we next examined the significance of autocrine BMP signaling in this character-defining function. These studies first identified that autocrine BMP signaling in NK cells is required for their optimal expression of the activation markers CD69 and NKp46 (Fig. 6A). Moreover, NK cells cocultured with K562 target cells in the presence of DMH1 completely failed to release IFN $\gamma$  (Supplementary Fig. S5A). Finally, NK cells activated with IL2, IL12, and poly I:C in the presence of DMH1 had reduced expression of the cytotoxic granule marker LAMP1/CD107a upon subsequent coculture with K562 target cells (Fig. 6B), which most importantly, directly correlated with a dramatic reduction in killing capacity (Fig. 6C). However, the addition of DMH1 during the 4-hour cytotoxicity assay had no inhibitory effect on NK cells' cytolytic capacity (Supplementary Fig. S5B). Taken together, our data define autocrine BMP signaling as an inherent pathway underpinning NK cells' most defining property, killing.

In our concluding analyses, we wished to understand if NK cells from patients with cancer displayed some changed phenotypic expression within the BMP signaling system and whether this correlated with other important markers of NK cell activation. To this end, we collected bone marrow samples from patients with ALL who were assessed as being at low/intermediate or high risk of relapse, or those having already relapsed. The analysis demonstrated that NK cells from relapsed patients had significantly reduced expression of the activation marker CD69 as well as the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46 (Fig. 7). Conversely, high risk and relapsed patients coexpressed increased levels of the inhibitory receptors NKG2A and KIR2DL2/L3, respectively. Most



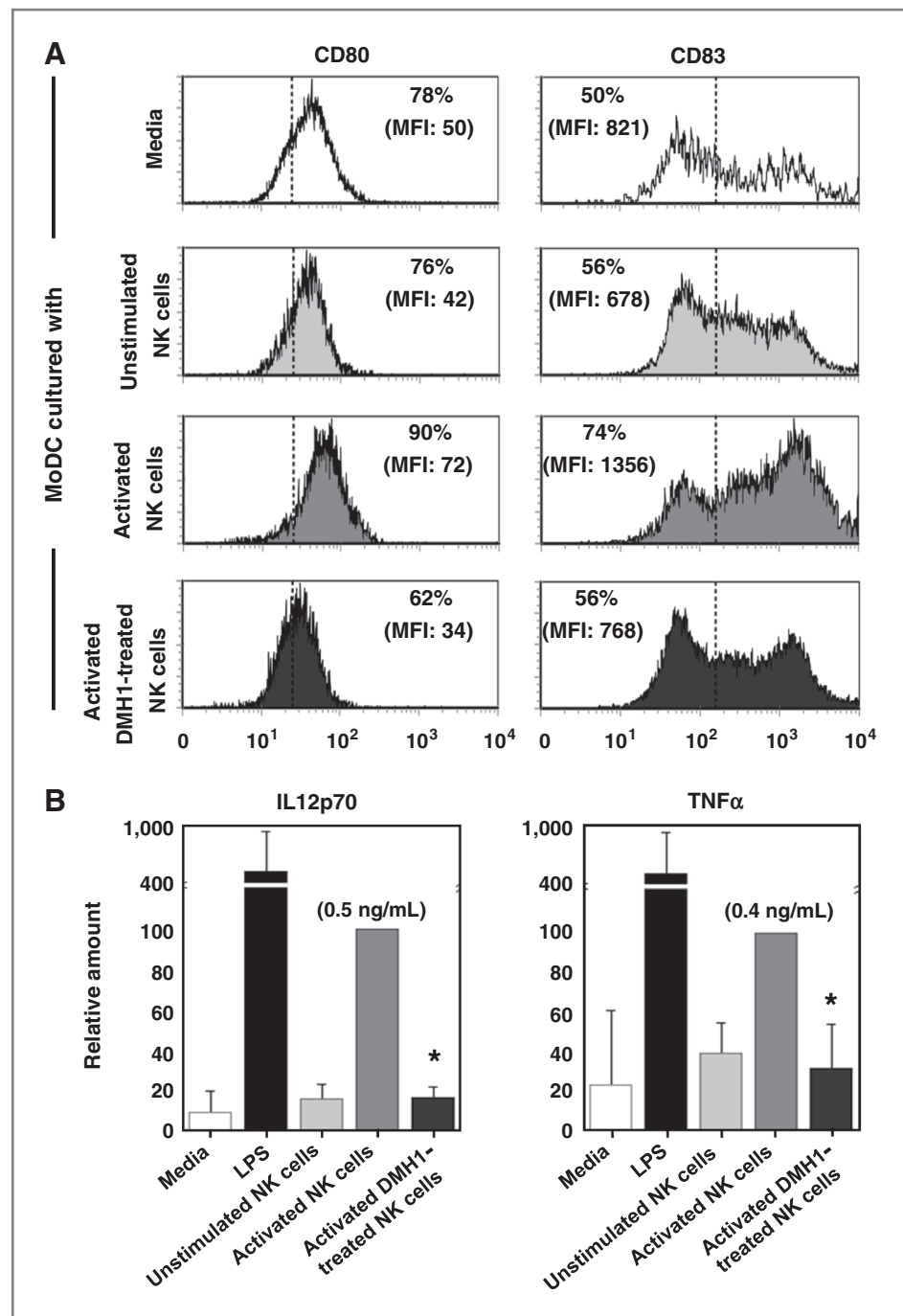
**Figure 4.** The BMPRIA inhibitor DMH1 decreases NK cells' cytokine and chemokine production. MACS-purified NK cells (purity  $\geq 95\%$ ) were cultured in IL2, IL12, and poly I:C with or without the addition of DMH1 (5–50 µmol/L) or DMSO as vehicle control or noggin (100 ng/mL). A, p-Smads-1/-5/-8 expression was determined after 20 hours by intracellular staining and flow cytometry. B and C, NK cell supernatants were collected after 20 hours of culture and IFN $\gamma$  production determined by ELISA. D, Annexin V expression was determined by flow cytometry and in E, the indicated cytokine and chemokine levels were determined using a cytometric bead array system. A and D, one representative donor of three is shown and in B, C, and E, the data are the mean  $\pm$  SD of two or three separate donors. \*,  $P < 0.01$  versus no addition of noggin or DMH1.

importantly, the analysis demonstrated that bone marrow NK cells from high-risk patients had significantly reduced ( $P < 0.05$ ) expression of the high-affinity BMP binding receptor BMPRIA and relapsed patients had reduced ( $P = 0.06$ ) expression (Fig. 7). Thus, lower levels of BMPRIA expression correlate with an NK cell phenotype representing reduced activatory marker and increased inhibitory marker expression.

## Discussion

A major distinguishing feature separating the BMPs from the TGF $\beta$ s and activins is that the BMPs predominantly signal via a complex of p-Smads-1/-5/-8, whereas the TGF $\beta$ s and activins share the use of Smads-2 and -3 (14). It was these differences in Smad usage that led to the synthesis of our hypothesis that BMP signaling might influence NK cells'

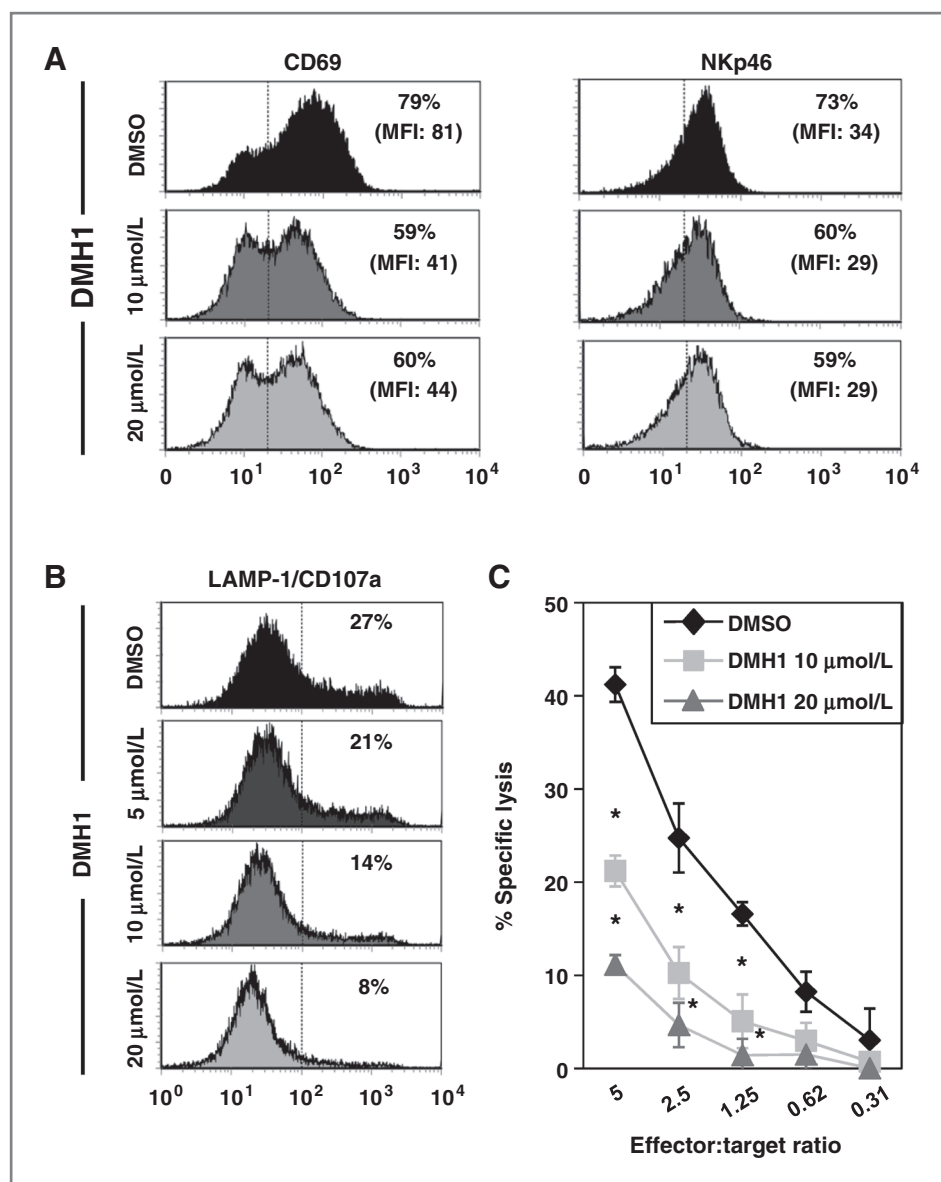
**Figure 5.** DMH1-treated NK cells display a reduced capacity to induce DC maturation. NK cells were cultured for 12 hours in culture media or IL2 (20 ng/mL) or IL2, IL12, and poly I:C with or without the addition of DMH1 (20  $\mu$ mol/L). NK cells were then washed three times before additional culture alone or together with immature *in vitro* derived MoDCs at a ratio of 1:5. After 18 hours of culture, the levels of CD80 and CD83 expressed by MoDCs (A) was determined by flow cytometry and in B, the levels of IL12p70 and TNF $\alpha$  in the culture supernatants were determined by ELISA. One representative donor of three is shown in A and the data are the mean  $\pm$  SD of three separate donors in B. \*,  $P < 0.01$  versus IL2-, IL12-, and poly I:C-activated NK cells without DMH1 treatment. B, the addition of LPS to MoDC served as a positive control.



effector functions differently to the inhibitory signals provided by TGF $\beta$ 1 (10,46) or activin-A (11). Our first PCR-based screen aimed to identify whether blood-circulating human NK cells (and CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  T cells) express a genetic signature indicative of a capacity to respond to and/or produce specific BMP ligands. These results identified that NK cells express mRNAs for BMPRIA (the principal BMP ligand binding receptor) as well as mRNAs for BMPRII (the exclusive BMP type II receptor; ref. 14). It is interesting that neither NK cells nor CD4 $^{+}$  or CD8 $^{+}$  T cells expressed mRNAs for BMPRIIB. These

data are therefore the first to demonstrate that NK cells have the genetic makeup to express the prototypic BMP type I–II receptor pair. Furthermore, the analysis revealed the novel findings that these same NK cells contained mRNAs for distinct BMP ligands, i.e. BMP-2 and -6 but not BMP-4 or -7. In comparison with CD4 $^{+}$  or CD8 $^{+}$  T cells, NK cells were exclusive in their expression of BMP-2 mRNAs, but interestingly, each lymphocyte population expressed BMP-6 mRNAs. Taken together, this information formed the foundation of our investigations, which led to our demonstration that inhibition of





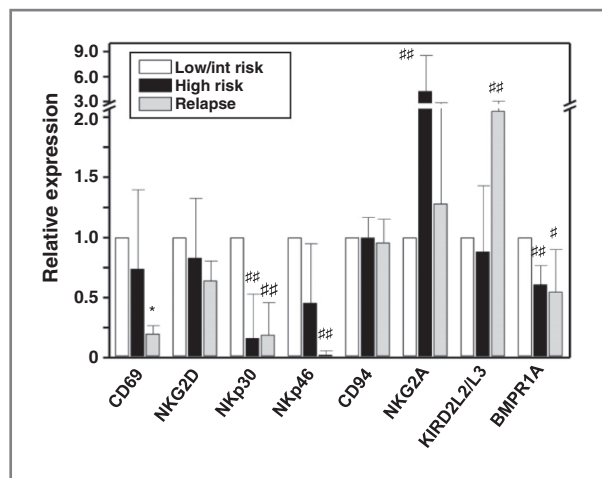
**Figure 6.** DMH1-treated NK cells are less phenotypically activated and have a reduced capacity to kill. **A**, NK cells were stimulated with IL2, IL12, and poly I:C for 12 hours in the absence or presence of the indicated doses of DMH1 or DMSO as vehicle control and the expression of CD69 and NKp46 was determined by flow cytometry. **B** and **C**, NK cells were treated as in **A**, then cocultured for 4-hours with K562 target cells before LAMP1/CD107a expression was determined by flow cytometry (**B**) and cytotoxicity determined by specific lysis (**C**). One representative donor of three is shown in **A** and **B**, whereas in **C**, the specific lysis data are the mean  $\pm$  SD of three separate donors. \*,  $P < 0.01$  versus DMSO.

autocrine BMP signaling in cytokine and TLR-3-stimulated NK cells confers optimal (i) IFN $\gamma$  and global cytokine and chemokine production; (ii) phenotypic activation and proliferation; (iii) autologous DC activation; and (iv) cytotoxicity.

To date, the literature describing roles for TGF $\beta$  superfamily members in the mediation of NK cells effector functions has almost exclusively focused on TGF $\beta$ 1. However, we recently demonstrated that activin-A displays some similarities in function to TGF $\beta$ 1 in that it inhibits NK cells proliferation and cytokine and chemokine production, but unlike TGF $\beta$ 1, does not directly affect their cytolytic capacity (11). This is particularly relevant considering we have found that activated human CD1c<sup>+</sup> myeloid DCs and MoDCs produce large amounts of activin-A yet questionable levels of TGF $\beta$ 1 (47). These findings are intriguing and raise the possibility that it is DC-derived activin-A that is the most relevant negative regu-

lator of NK cells' functions during bidirectional DC/NK cross-talk.

Most interestingly, our current findings open the possibility that individual TGF $\beta$  superfamily members may play very distinct (as yet unrealized) roles in NK cell biology. Contextually, our current studies complement and extend our recent report that shows that the subpopulation of early human intrathymic CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> progenitor cells that express BMPRIA contains a large population of NK cell lineage committed precursor cells (12). Indeed, in the presence of exogenous IL15 autocrine BMP signaling promotes human intrathymic progenitor differentiation *in vitro* into an immature CD56<sup>low</sup>CD161<sup>low</sup> population that remains predominantly BMPRIA<sup>+</sup> and then a major mature CD56<sup>int/hi</sup>CD161<sup>hi</sup> population that has mostly lost BMPRIA expression (12). Likewise, our analysis of human lymph node resident NK cells demonstrated that BMPRIA expression



**Figure 7.** Human ALL patients' NK cells display reduced expression of the high-affinity BMP-binding receptor BMPRIA. Bone marrow aspirates were taken from patients with ALL diagnosed as low/intermediate or high risk of relapse, or relapsed ( $n = 7$ , 5, and 5 respectively). Bone marrow cells were stained with combinations of fluorochrome-labeled antibodies against CD3, CD45, CD56, CD69, NKG2D, NKp30 and 46, CD94, NKG2A, KIR2DL2/L3, and BMPRIA before the cells were analyzed by flow cytometry. All  $P$  values are calculated against the low/intermediate group and \*,  $P < 0.01$ ; ##,  $P < 0.05$ ; #,  $P < 0.06$ .

diminished sequentially from stage 2 pre-NK cells to stage 4 mature NK cells.

Consistent with these observations, our new data show that freshly isolated blood circulating NK cells express mRNAs for BMPRIA but that these cells only express low levels of cell surface BMPRIA. This finding was surprising considering BMPRIA is thought to be the dominant ligand binding receptor and that these same donors CD56<sup>hi</sup> NK cells expressed significant levels of cell surface BMPRII (see Fig. 2B). These results prompted a more in depth investigation that led to the striking findings that the majority of freshly isolated (cell surface BMPRIA low) NK cells have intracellular stores of BMPRIA and that a significant proportion of these express p-Smad-1/-5/-8. Interestingly, our BMPRIA intracellular staining data is in line with Song and colleagues who have shown similar results in transfected mouse C2C12 myoblast cell lines and human HEK 293 embryonic kidney cells (48). These intracellular stores of BMPRIA may be essential for NK cells further BMP responsiveness, a suggestion supported by our findings that the addition of DMH1 profoundly inhibits NK cells effector functions. Moreover, it is noteworthy that the addition of potent activatory signals to NK cells such as IL2 in combination with IL12 and poly I:C or co-culture with K562 targets or activated DCs had no effect on NK cells surface expression of BMPRIA nor their net expression of BMPRII. Considering such stimuli are well known to induce or reduce the expression of a number of important receptors on NK cells, including IL12p70 and TGF $\beta$  receptors (respectively; ref. 11), it stands out that the only factor we have tested that results in altered (increased) BMPRIA expression was the addition of recombinant BMP-2 (data not shown). It is certainly possible that BMPs produced by NK cells or other immune or stromal cells could trigger receptor exocytosis thus making the receptor available to bind

exogenous ligand. Alternatively, a mechanism may be in place whereby BMPRIA containing "compartments" could fuse with ligand and BMPRII containing endosomes (or other forms of vesicles) to facilitate signaling. In this regard Shi and colleagues described that the FYVE-domain protein endofin, which largely localizes in early endosomes, binds Smad-1 preferentially and enhances Smad-1 phosphorylation and nuclear localization upon BMP stimulation (49). This result suggests that BMP signaling could well be initiated in an early endocytic compartment. Similarly, two other FYVE-domain proteins (SARA and Hgs) also localize in early endosomes and mediate the initiation of TGF $\beta$ /activin signaling favoring receptor-induced activation of Smads-2 and -3 (50, 51).

Our initial findings that Compound C/dorsomorphin profoundly inhibited NK cells capacity to kill the K562 human leukemic tumor cell line and inhibited their production of IFN $\gamma$  significantly raised our awareness of the potential importance of this pathway to NK cells. Indeed, it was this data that prompted our more exhaustive investigations of the effects of BMP signaling inhibition via complementary usage of its natural antagonist noggin and the BMPRIA and ActRIA inhibitor DMH1. Our data demonstrates that autocrine BMP signaling confers a number of character defining functions to NK cells thus supporting our original hypothesis i.e. that BMP signaling in NK cells may result in functionally distinct outcomes to those induced by activin-A or TGF $\beta$ . Indeed, in the absence of autocrine BMP signaling, NK cells' capacity to proliferate was severely compromised, as was their capacity to (i) produce inflammatory cytokines and chemokines, (ii) express phenotypic markers of activation that are known to play important coactivatory roles, (iii) bidirectionally activate autologous DCs, and finally and most importantly, (iv) kill.

The sum of this inhibition could be devastating and life threatening. For example, an NK cell encountering a BMP antagonist-producing tumor or oncogenic virus-infected cell *in vivo* may become incapacitated and thus functionally defunct. An outcome such as this could clearly have substantial "knock-on" effects, potentially resulting in significantly compromised immunity. This raises the very important question as to the potential production of various BMPs by distinct immune cell populations and to the potential production of BMP antagonists by tumor cells. Indeed, in the context of tumorigenesis, our findings are intriguing and clearly point to the value of a detailed analysis of human immune cell and tumor cell-specific expression of BMP receptors, ligands, and antagonists.

This is especially relevant considering our finding that NK cells resident in the bone marrow of high risk of relapse ALL patients have reduced expression of ligand binding BMPRIA. This raises the possibility that NK cells from patients with some forms of cancer may have a reduced capacity to bind BMP ligands, thus leading to a reduced capacity to receive the activatory signal provided by p-Smad-1/-5/-8 signaling. Clearly, we need to extend this analysis and assess the expression of BMP receptors (cell surface and intracellular) and levels of p-Smad-1/-5/-8 signaling in NK cell populations from patients with other types of cancer. Finally, given inhibition of BMP signaling can so potently inhibit NK cells' effector functions, deliberate activation of this pathway is a logical next step to

understand whether this approach may generate hyperactivated NK cells that are more potent in the killing of tumor cells for immunotherapy. Taken together, our findings have identified a major new piece in the complex puzzle that is the biology of NK cells.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

A.S. MacDonald received commercial research grants from AstraZeneca and GlaxoSmithKline. A. Phytian-Adams received commercial research support from GlaxoSmithKline and AstraZeneca, which have funded the Manchester Collaborative Centre for Inflammation Research (MCCIR). No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

### Authors' Contributions

**Conception and design:** N.C. Robson, L. Hidalgo, T. McAlpine, E. Maraskovsky, A. Vicente, A. Varas

**Development of methodology:** N.C. Robson, T. McAlpine, R. Sacedón, A. Vicente, A. Varas

**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** N.C. Robson, L. Hidalgo, T. McAlpine, H. Wei, V.G. Martínez, A. Entrena, G.J. Melen, R. Sacedón, M. Ramírez

**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** N.C. Robson, L. Hidalgo, T. McAlpine, H. Wei, V.G. Martínez, A. Entrena, R. Sacedón, M. Ramírez, A. Vicente, A. Varas

**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** N.C. Robson, L. Hidalgo, T. McAlpine, A. Phytian-Adams, J. Cebon, M. Ramírez, A. Vicente, A. Varas

**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** V.G. Martínez, A. Entrena, A.S. MacDonald, J. Cebon, A. Vicente

**Study supervision:** N.C. Robson, L. Hidalgo, E. Maraskovsky, A. Vicente, A. Varas

### Acknowledgments

The authors thank Dr. Suzanne Graham for helpful discussion and proof reading the article.

### Grant Support

N.C. Robson was supported by an Industry Fellowship Grant from the Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC), The Ludwig Institute for Cancer Research, a Wellcome Trust Travelling Fellowship, and a Lord Kelvin Adam Smith Fellowship from the University of Glasgow. L. Hidalgo and A. Entrena are supported by predoctoral fellowships (AP2009-4324 and AP2010-0795, respectively) from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. E. Maraskovsky is an employee of CSL limited and an Honorary Senior Research Fellow of the Ludwig Institute for Cancer Research. J. Cebon is an NHMRC Practitioner Fellow. This work was supported by grants SAF2012-33180 (Ministerio de Economía y Competitividad), S2010/BMD-2420 (Comunidad de Madrid), and RD12/0019/0007 (Instituto de Salud Carlos III) to A. Varas and A. Vicente.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received October 7, 2013; revised May 19, 2014; accepted June 3, 2014; published OnlineFirst July 18, 2014.

### References

- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331:44-9.
- Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986;136:4480-6.
- Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003;101:3052-7.
- Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, et al. The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004;34:1715-22.
- Fernandez LA, Pope B, Lee C, Zayed E. Aggressive natural killer cell leukemia in an adult with establishment of an NK cell line. *Blood* 1986;67:925-30.
- Chan A, Filer A, Parsonage G, Kollnberger S, Gundle R, Buckley CD, et al. Mediation of the proinflammatory cytokine response in rheumatoid arthritis and spondylarthritis by interactions between fibroblast-like synoviocytes and natural killer cells. *Arthritis Rheum* 2008;58:707-17.
- Banchereau J, Pascual V, O'Garra A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol* 2012;13:925-31.
- Moretta A, Vitale M, Sivori S, Bottino C, Morelli L, Augugliaro R, et al. Human natural killer cell receptors for HLA-class I molecules. Evidence that the Kp43 (CD94) molecule functions as receptor for HLA-B alleles. *J Exp Med* 1994;180:545-55.
- Agaugue S, Marcenaro E, Ferranti B, Moretta L, Moretta A. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2008;112:1776-83.
- Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4120-5.
- Robson NC, Wei H, McAlpine T, Kirkpatrick N, Cebon J, Maraskovsky E. Activin-A attenuates several human natural killer cell functions. *Blood* 2009;113:3218-25.
- Hidalgo L, Martinez VG, Valencia J, Hernández-López C, Vázquez MN, Núñez JR, et al. Expression of BMPRIA on human thymic NK cell precursors: role of BMP signaling in intrathymic NK cell development. *Blood* 2012;119:1861-71.
- Mueller TD, Nickel J. Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett* 2012;586:1846-59.
- Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20:343-55.
- Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Cárcamo J, Harland RM, et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 1996;381:620-3.
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-34.
- Plikus MV, Mayer JA, de la Cruz D, Baker RE, Maini PK, Maxson R, et al. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature* 2008;451:340-4.
- Liu A, Niswander LA. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:945-54.
- Francis PH, Richardson MK, Brickell PM, Tickle C. Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* 1994;120:209-18.
- Vukicevic S, Latin V, Chen P, Batorsky R, Reddi AH, Sampath TK. Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: high affinity binding to basement membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;198:693-700.
- Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ. A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 1995;9:2795-807.
- Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2003;21:1025-32.
- Ozkaynak E, Schnegelsberg PN, Oppermann H. Murine osteogenic protein (OP-1): high levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179:116-23.

25. Kingsley DM, Bland AE, Grubber JM, Marker PC, Russell LB, Copeland NG, et al. The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily. *Cell* 1992;71:399–410.
26. Gong Y, Krakow D, Marcelino J, Wilkin D, Chitayat D, Babul-Hirji R, et al. Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis. *Nat Genet* 1999;21:302–4.
27. Lehmann K, Seemann P, Stricker S, Sammar M, Meyer B, Süring K, et al. Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12277–82.
28. Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Cho TJ, Choi IH, et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet* 2006;38:525–7.
29. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufman RJ, Rosen V, Cox KA, et al. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo*. *Growth Factors* 1996;13:291–300.
30. Kotzsch A, Nickel J, Seher A, Heinecke K, van Geersdaele L, Herrmann T, et al. Structure analysis of bone morphogenetic protein-2 type I receptor complexes reveals a mechanism of receptor inactivation in juvenile polyposis syndrome. *J Biol Chem* 2008;283:5876–87.
31. Harth S, Kotzsch A, Hu J, Sebald W, Mueller TD. A selection fit mechanism in BMP receptor IA as a possible source for BMP ligand-receptor promiscuity. *PLoS ONE* 2010;5.
32. Alarcon C, Zaromytidou AI, Xi Q, Gao S, Yu J, Fujisawa S, et al. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell* 2009;139:757–69.
33. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massagué J, et al. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 1999;401:480–5.
34. Takase M, Imamura T, Sampath TK, Takeda K, Ichijo H, Miyazono K, et al. Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:26–9.
35. Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 1998;12:186–97.
36. Casellas R, Brivanlou AH. Xenopus Smad7 inhibits both the activin and BMP pathways and acts as a neural inducer. *Dev Biol* 1998;198:1–12.
37. Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 1999;400:687–93.
38. Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:974–9.
39. Katsuno Y, Hanyu A, Kanda H, Ishikawa Y, Akiyama F, Iwase T, et al. Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway. *Oncogene* 2008;27:6322–33.
40. Langenfeld E, Hong CC, Lanke G, Langenfeld J. Bone morphogenetic protein type I receptor antagonists decrease growth and induce cell death of lung cancer cell lines. *PLoS ONE* 2013;8:e61256.
41. Hardwick JC, Van Den Brink GR, Bleuming SA, Ballester I, Van Den Brande JM, Keller JJ, et al. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* 2004;126:111–21.
42. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 2006;444:761–5.
43. Martinez-Laperche C, Gomez-Garcia AM, Lassaletta A, Moscardó C, Vivanco JL, Molina J, et al. Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse. *Am J Hematol* 2013;88:359–64.
44. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* 2008;4:33–41.
45. Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM. The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 1996;86:599–606.
46. Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol* 2005;6:600–7.
47. Robson NC, Phillips DJ, McAlpine T, Shin A, Svobodova S, Toy T, et al. Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood* 2008;111:2733–43.
48. Song GA, Kim HJ, Woo KM, Baek JH, Kim GS, Choi JY, et al. Molecular consequences of the ACVR1(R206H) mutation of fibrodysplasia ossificans progressiva. *J Biol Chem* 2010;285:22542–53.
49. Shi W, Chang C, Nie S, Xie S, Wan M, Cao X. Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J Cell Sci* 2007;120:1216–4.
50. Itoh F, Divecha N, Brocks L, Oomen L, Janssen H, Calafat J, et al. The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF-beta/Smad signalling. *Genes Cells* 2002;7:321–31.
51. Miura S, Takeshita T, Asao H, Kimura Y, Murata K, Sasaki Y, et al. Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol Cell Biol* 2000;20:9346–9355.



# Mesenchymal Stromal Cells Derived from the Bone Marrow of Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Show Altered BMP4 Production: Correlations with the Course of Disease

Ángeles Vicente López<sup>1\*</sup>, Miriam Nohemí Vázquez García<sup>1\*</sup>, Gustavo J. Melen<sup>2</sup>, Ana Entrena Martínez<sup>1</sup>, Isabel Cubillo Moreno<sup>3</sup>, Javier García-Castro<sup>3</sup>, Manuel Ramírez Orellana<sup>2</sup>, Agustín Gregorio Zapata González<sup>4\*</sup>

**1** Department of Cell Biology, School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain, **2** Department of Oncohematology, Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain, **3** Cellular Biotechnology Unit, Institute for Health Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain, **4** Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

## Abstract

The relevance of tumor microenvironment for the development and progression of tumor cells in hematological malignancies has been extensively reported. Identification of factors involved in the information exchange between the malignant cells and the bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) and the knowledge on their functioning may provide important information to eliminate leukemic cells from protective BM niches. We evaluated changes in BM-MSCs obtained from children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) at different times in the course of disease. Whereas ALL-MSCs did not exhibit phenotypic changes compared to BM-derived MSCs isolated from healthy donors, they exhibited increased adipogenic capacity. In addition, the viability of healthy CD34+ hematopoietic progenitors was significantly reduced when co-cultured with ALL-MSCs. ALL-MSCs grow less efficiently, although gradually recover normal growth with treatment. Accordingly, proliferation is particularly low in MSCs obtained at diagnosis and in the first days of treatment (+15 days), recovering to control levels after 35 days of treatment. Correlating these results with bone morphogenetic protein 4 (BMP4) production, a molecule demonstrated to affect MSC biology, we found higher production of BMP4 in ALL-MSCs derived from patients over the course of disease but not in those free of leukemia. However, no significant differences in the expression of different members of the BMP4 signaling pathway were observed. Furthermore, an inverse correlation between high levels of BMP4 production in the cultures and MSC proliferation was found, as observed in MSCs derived from patients at diagnosis that produce high BMP4 levels. In addition, co-culturing ALL-MSC with the REH leukemia cell line, but not CD34+ hematopoietic progenitors, powerfully enhanced BMP4 production, suggesting an intimate crosstalk among ALL-MSCs isolated from BM colonized by ALL cells that presumably also occurs in situ conditions. Our data may support the participation of BMP4 in BM niche, but the mechanism remains to be elucidated.

**Citation:** Vicente López Á, Vázquez García MN, Melen GJ, Entrena Martínez A, Cubillo Moreno I, et al. (2014) Mesenchymal Stromal Cells Derived from the Bone Marrow of Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Show Altered BMP4 Production: Correlations with the Course of Disease. PLoS ONE 9(1): e84496. doi:10.1371/journal.pone.0084496

**Editor:** Graca Almeida-Porada, Wake Forest Institute for Regenerative Medicine, United States of America

**Received:** August 29, 2013; **Accepted:** November 14, 2013; **Published:** January 6, 2014

**Copyright:** © 2014 Vicente López et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants BFU2009-10315, SAF2012-33180, and BFU2010-18250 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, Spanish Association Against Cancer 2010 AECC; P2010/BMD-2420-CellCAM from Regional Government of Madrid and RD12/0019/0007-TerCell Network from the Health Institute Carlos III. MNVG contract UCM number 50053735 by Comunidad de Madrid. AE grant number AP2010-0795 of Ministry of Education, Culture and Sports. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: avicente@bio.ucm.es (AVL); zapata@ucm.es (AGZG)

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Bone marrow (BM) microenvironments are involved in the initiation and propagation of hematological diseases [1,2]. It has been proposed that leukemia cells “hijack” the homeostatic mechanisms of the normal BM microenvironment in a process that becomes key for the response to chemotherapy and disease relapse [3]. Mesenchymal stromal cells (MSCs) are now recognized as the essential element of both healthy and leukemic hematopoietic microenvironments [4]. MSCs were first described as a BM-derived mononuclear cell fraction that, after ex vivo culture, adheres to plastic, acquires a fibroblast-like morphology

[5], exhibits a non-hematopoietic phenotype, and shows capacity to differentiate into multiple mesodermal cell lineages [6]. Their role in hematological disorders has been particularly emphasized, but most of our knowledge of these topics comes from xenograft models, where cancer cells grow in non-physiological conditions, or using cell culture models where MSC are derived from healthy adult donors or even MSC are commercial lines. Little is known regarding the features of MSCs in cancer pediatric patients specifically in patients suffering acute lymphoblastic leukemia, the most common cancer diagnosed in children.

**Table 1.** Clinic data of patients.

Patient	Sex	Age	ALL-Immunophenotype	Cytogenetics	Risk	Current Situation	Out of treatment
1	M	2	B-cell precursors	ND	L	In treatment-complete remission	NO
2	M	10	B-cell precursors	ND	L	3 <sup>rd</sup> year-complete remission	NO
3	M	10	B-cell precursors	ND	L	3 <sup>rd</sup> year-complete remission	NO
4	M	6	B-cell precursors	t(12;21)q(12;22)	L	2 <sup>nd</sup> year-complete remission	NO
5	F	2	B-cell precursors	ND	I	3 <sup>rd</sup> year-complete remission	NO
6	F	4	B-cell precursors	ND	I	2 <sup>nd</sup> year-complete remission	NO
7	F	5	B-cell precursors	ND	I	4 <sup>th</sup> year-complete remission	NO
8	M	5	B-cell precursors	ND	I	2 <sup>nd</sup> year-complete remission	NO
9	M	2	B-cell Precursors	45,XY,-20, del (1) (p31)	I	Intra-treatment relapse	NO
10	F	1	B-cell precursors	t(4;11)q(21;23)	H	Intra-treatment relapse and death	NO
11	M	14	B-cell precursors	t(9;22)q(4;11)	H	Intra-treatment relapse	NO
A	F	6	B-cell precursors	ND	I	4 <sup>th</sup> year-complete remission	1-year end of treatment follow up sample
B	F	9	B-cell precursors	t(12;21)q(12;22)	I	4 <sup>th</sup> year-complete remission	1-year end of treatment follow up the sample
C	M	10	B-cell precursors	ND	L	4 <sup>th</sup> year-complete remission	1-year end of treatment follow up sample

Note: M: male; F: female; ND: no determined; L: Low risk; I: Intermediate risk; H: High risk.  
doi:10.1371/journal.pone.0084496.t001

Many soluble and membrane-bound molecules have been related with the information exchange between malignant cells and BM-MSCs. In recent years, several studies have reported the relevance of BM stromal cells for the survival [7] and resistance to chemotherapy [8] of acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells homed in the BM. These studies emphasized the relevance of cell-to-cell contacts between BM stromal cells and leukemia cells [7,8] and the possible role played by certain molecules, such as IL7 [9], CXCR4 [10], and TGF $\beta$  [11]. In addition, bone morphogenetic proteins (BMPs), members of the TGF $\beta$  superfamily, and BM stroma are implicated in the development of hematopoietic neoplasms [12,13], including ALL [14]. BMP6 released from BM stroma inhibits human B lymphopoiesis in adults [15], and BMP2 regulates MSC differentiation in humans. BMP4 has been described as a critical component produced by the hematopoietic microenvironment that regulates both HSC number and function [13] and recently Khurana et al have implicated BMP4 also in homing and engraftment of mouse and human hematopoietic stem/progenitor cells [16]. We recently demonstrated that MSCs derived from human adipose tissue endogenously produce BMP4, express all the molecular machinery of BMP4 signaling pathway, and respond in a concentration-dependent manner to the stimulation of this pathway [17]. In addition, in recent years the contribution of BMP4 to cancer pathogenesis has been emphasized reporting both protumoral and antitumoral effects of this morphogen, depending on the kind and level of risk of tumor [18]. Furthermore, BMP4 produced by tumor microenvironment seems to be important for the biology of numerous hematological [12,19], and non-hematological tumors [20,21,22] although few studies have analyzed the cellular component responsible for such production, the autocrine effects or the stimulus responsible for this production.

In this study, we analyzed the behaviour of MSC in paediatric patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL-MSCs), with special emphasis in the inverse correlation between high levels of BMP4 production in the cultures and MSC proliferation at diagnosis, during treatment and after remission (out of therapy), as

well the relevance of leukemic cells in the powerfully enhanced BMP4 production of MSC at diagnosis and finally the important contribution of BMP4 in maintaining MSC in the hematopoietic niche. Our results indicate that BMP4 produced by BM stromal cells importantly influences on ALL cells.

## Materials and Methods

### Patients and samples

BM aspirates from eleven children diagnosed with B-cell precursor ALL at the Hospital del Niño Jesus (Madrid, Spain) were collected. The main characteristics of the patients in this study and the entire group are summarized in Table 1. BM samples were drawn at diagnosis (ALL-MSC-Diagnosis), and at 15 (ALL-MSC+15) and 35 days (ALL-MSC+35) after initiation of therapy; in some experiments, samples 52 and 70 days after therapy initiation (ALL-MSC+52, ALL-MSC+70) were used. Children were treated under the PETHEMA protocol (stands for Spanish Protocol for Malignant Hemopathies. Results of these protocols have been previously reported [23,24]), and all samples after diagnosis were in complete haematological remission. Aspirates from three children with B-cell precursor ALL who recovered without signs of disease and out of therapy (OOT-MSC) (Table 1) and from six children with no haematological diseases (Healthy-MSC) were also obtained. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital del Niño Jesus and written informed consent was obtained from parents/tutors on the behalf of the minors/children participants.

### Cord blood samples and leukemic cell lines

Cord blood Lin-CD34+ precursor cells were isolated using the CD34 Progenitor Cell Isolation Kit Miltenyi Biotec, followed by a negative selection to eliminate Lin+ cells.

The ALL cell lines were obtained from DSMZ (German collections of Microorganisms and Cell Culture) REH (ACC-22) and NALM6 (ACC128) both are B-cell precursor leukemia. The

cell lines were maintained at a density of  $1 \times 10^6$  cells/mL in RPMI-1640 (GIBCO) in 10% FBS with antibiotics.

### Cell culture

MSCs were isolated and cultured as previously described [17,25]. Once the cultures reached 80–90% confluence, the cells were recovered by supplying 0.25% trypsin solution (Gibco-Invitrogen) and counted in a hemocytometer. Cell viability was assessed by trypan blue staining, and the cells were replated at a density of  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>. The cells were maintained and expanded in MesenPRO-RS<sup>TM</sup> medium (Gibco-Invitrogen), with antibiotics and L-glutamine in a 5% CO<sub>2</sub>-in-air incubator at 37°C. All experiments were performed with cells harvested between the fifth and tenth passage.

### Flow cytometry

The following mAbs conjugated with FITC, PE or APC were used for flow cytometric analysis: CD14, CD19, CD29, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105 and HLA-DR (BD Biosciences, BioLegend, and Immunostep). For intracellular staining of phosphorylated SMAD1, cells were treated with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences), washed with Perm/Wash buffer III (BD Biosciences) and stained with anti-human phospho-Smad1/5/8 (Santa Cruz), followed by fluorochrome-conjugated multi-absorbed F(ab')<sub>2</sub> fragment of donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) at the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Complutense University-Madrid-Spain) (CCMF-UCM) and a FACS Canto II (BD Bioscience) with the FACS Diva software, at the Hospital Niño Jesús.

### Proliferation assays

Cultures were pulsed for 12 hours with 10  $\mu$ M BrdU. A BrdU Labeling and Detection Kit III (ROCHE) were used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA, as described previously [17].

### Apoptosis assays

Cells were stained with Annexin-V-FITC (ROCHE) and propidium iodide, and analyzed by flow cytometry. Annexin-V-positive and propidium iodide-negative cells were considered apoptotic cells [17].

### BMP4 measurements

The concentration of BMP4 in the culture supernatants was determined using a specific ELISA assay kit (R & D Systems) [17], following the manufacturer's instructions.

### BMP4 and dorsomorphin treatment

Healthy-MSC and ALL-MSC-diagnosis were cultured for six days in Mesen PRO-RS<sup>TM</sup> medium supplemented with human recombinant BMP4 (0.01–100 ng/mL). For treatment with dorsomorphin (Calbiochem, Nottingham), cells were cultured in Mesen PRO-RS<sup>TM</sup> medium for 24 h and then the medium was supplemented with the inhibitor (2–10  $\mu$ M) for five more days. After treatment, MSCs were harvested and used for viability assays or processed for determining cell proliferation.

### PCR analysis

Real-time PCR reactions were performed with specific TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems), as described previously [17]. Expression was normalized using GNB2L1 and

calculated based on CT values [17]. Amplifications, detections, and analyses were performed in a 7.900HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, Complutense University, Madrid, Spain).

### Differentiation assays

The procedures were adapted from previous protocols [25]. BM-MSCs were plated at a cell density of 5000 cells/cm<sup>2</sup> and grown for six days in Mesen PRO-RS<sup>TM</sup> medium. The cells were then cultured with adipogenic or osteogenic differentiation medium [17]. After six days of differentiation, the cells were collected for quantitative PCR analysis. After fifteen to twenty days, lipid and ALP quantification was performed as previously described [26,27].

### Co-culture assays

ALL-MSCs were co-cultured with either CD34+ cells purified from cord blood units using immunomagnetic methods (Miltenyi Biotech) or the B-precursor leukemic cell line REH (ratio MSC:CD34+ and MSC:REH, 1:20). Viability of cells was determined separately for hematopoietic cells (identified as CD45+ cells) and MSCs (CD105+ cells) by flow cytometry after five days in culture.

### Statistical analysis

The Mann-Whitney (Wilcoxon) test and Student *t* test were used for statistical analysis. \**P* ≤ 0.05, \*\**P* ≤ 0.01.

## Results

### Immunophenotype of leukemic and healthy MSCs

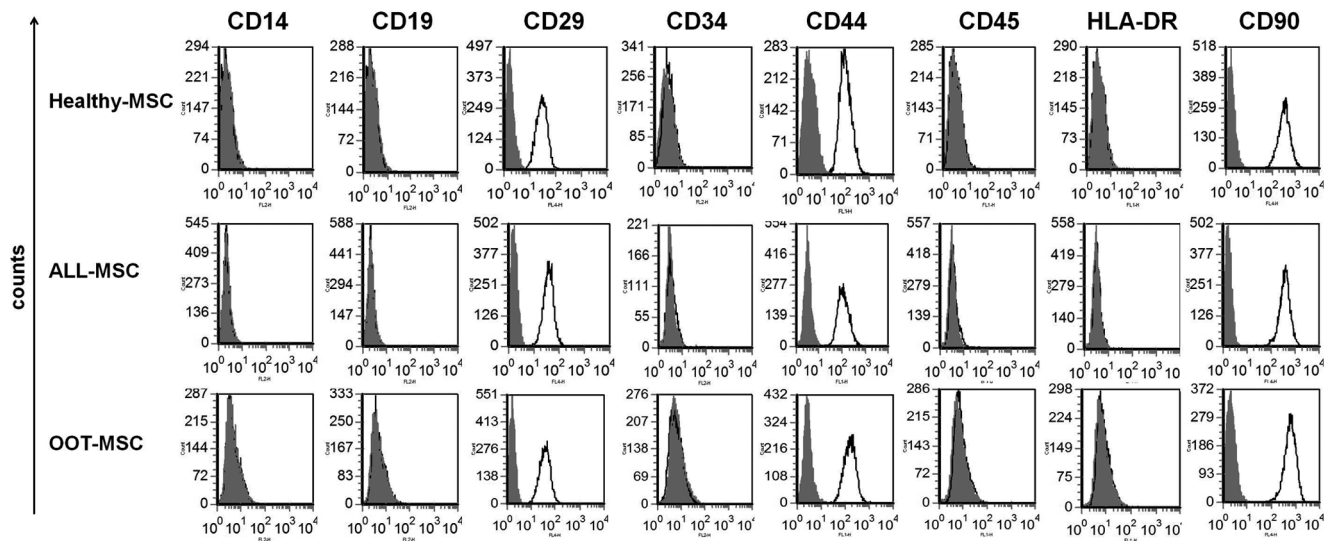
Healthy-MSCs, OOT-MSCs and ALL-MSCs expressed typical MSC markers, including CD29, CD44, and CD90, but no hematopoietic cell markers (CD14, CD19, CD34 or CD45) or the MHC class II molecules, including HLA-DR (Fig. 1). No significant changes were detected in the expression of studied markers among the different groups of MSCs.

### Growth kinetics of leukemic and healthy MSCs

Despite the high variability found among the samples, the growth pattern over 10 days was similar for Healthy-MSCs and ALL-MSCs (Fig. 2A). In both Healthy-MSCs and ALL-MSC cultures, an initial decrease of MSC numbers on day 1 was followed by a gradual increase at later time points. However, whereas ALL-MSC-Diagnosis and ALL-MSC+15 numbers did not recover to control levels, ALL-MSC+35 reached control values by day 10 of culture. OOT-MSC showed a robust growth throughout the culture (Fig. 2A). In agreement with the reduced MSC numbers found in ALL-MSC-Diagnosis and ALL-MSC+15 cultures (Fig. 2A), both showed a significant decrease in the proliferative rate compared with healthy levels (Fig. 2B). In contrast, ALL-MSC+35 showed similar proliferation levels as healthy cells (Fig. 2B). OOT-MSCs showed higher proliferation rates than healthy cells, although the differences were not statistically significant (Fig. 2B).

### Differentiation capabilities of healthy and leukemic MSC

In vitro capacity for adipogenic and osteogenic differentiation was evaluated in Healthy-MSCs and ALL-MSCs (Fig. 2C–F). Prior to differentiation, both ALL-MSCs and Healthy-MSCs expressed similar levels of NANOG and OCT4, two markers that confirmed the undifferentiated condition of the MSC groups (Fig. 2C). Whereas ALL-MSC-Diagnosis and OOT-MSC groups



**Figure 1. Surface marker expression pattern of MSCs derived from BM of ALL patients.** No significant changes were observed in the expression of molecules between Healthy-MSC, ALL-MSC and OOT-MSC. Gray histograms represent background fluorescence using isotype-matched irrelevant mAbs.

doi:10.1371/journal.pone.0084496.g001

exhibited an adipogenic differentiation capacity similar to healthy cells, ALL-MSCs from treated patients (+15 and +35) showed an increased adipogenic differentiation compared to healthy cells (Fig. 2D). Concomitantly, we observed a higher expression of genes specifically involved in adipogenesis, CEBP and PPAR $\gamma$ , in these samples (Fig. 2F). In contrast, no significant differences were found in ALP expression in both ALL-MSCs and OOT-MSCs compared to Healthy-MSCs (Fig. 2E). Furthermore, the induced expression of the osteogenic gene RUNX2 was similar in all samples analyzed (Fig. 2F).

#### ALL-MSCs differentially affect survival of healthy and leukemia cell progenitors

Because controversial results have been published on the capacities of leukemia microenvironments for differentially supporting the growth of normal hematopoietic and leukemia cells [28], we evaluated the effects of ALL-MSCs on the survival of either cord blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors or REH, a leukemic cell line, by co-culturing both cell types with ALL-MSCs. The viability of CD45<sup>+</sup> cells co-cultured with ALL-MSC was compared to healthy or leukemia cells co-cultured with Healthy-MSCs (Fig. 3). Co-culturing leukemia REH cells with ALL-MSCs did not affect REH cell viability compared to co-cultures with the Healthy-MSC controls. However, viability was reduced significantly in healthy CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors co-cultured with MSCs derived from patients at the first stages of the disease (-Diagnosis, +15, +35, +52, +70) and OOT-MSC. The relative survival of healthy hematopoietic progenitors recovered normal values when co-cultured with ALL-MSCs derived from +52 patients (Fig. 3).

#### BMP4 production by healthy and leukemic MSCs at distinct stages of the disease

ALL-MSCs obtained at diagnosis showed 12-fold more BMP4 in the culture supernatants than Healthy-MSCs. After 15 days of treatment (+15), this difference was reduced to just two-fold, although in both cases the differences with control values were statistically significant. In contrast, BM-MSCs of patients after 35

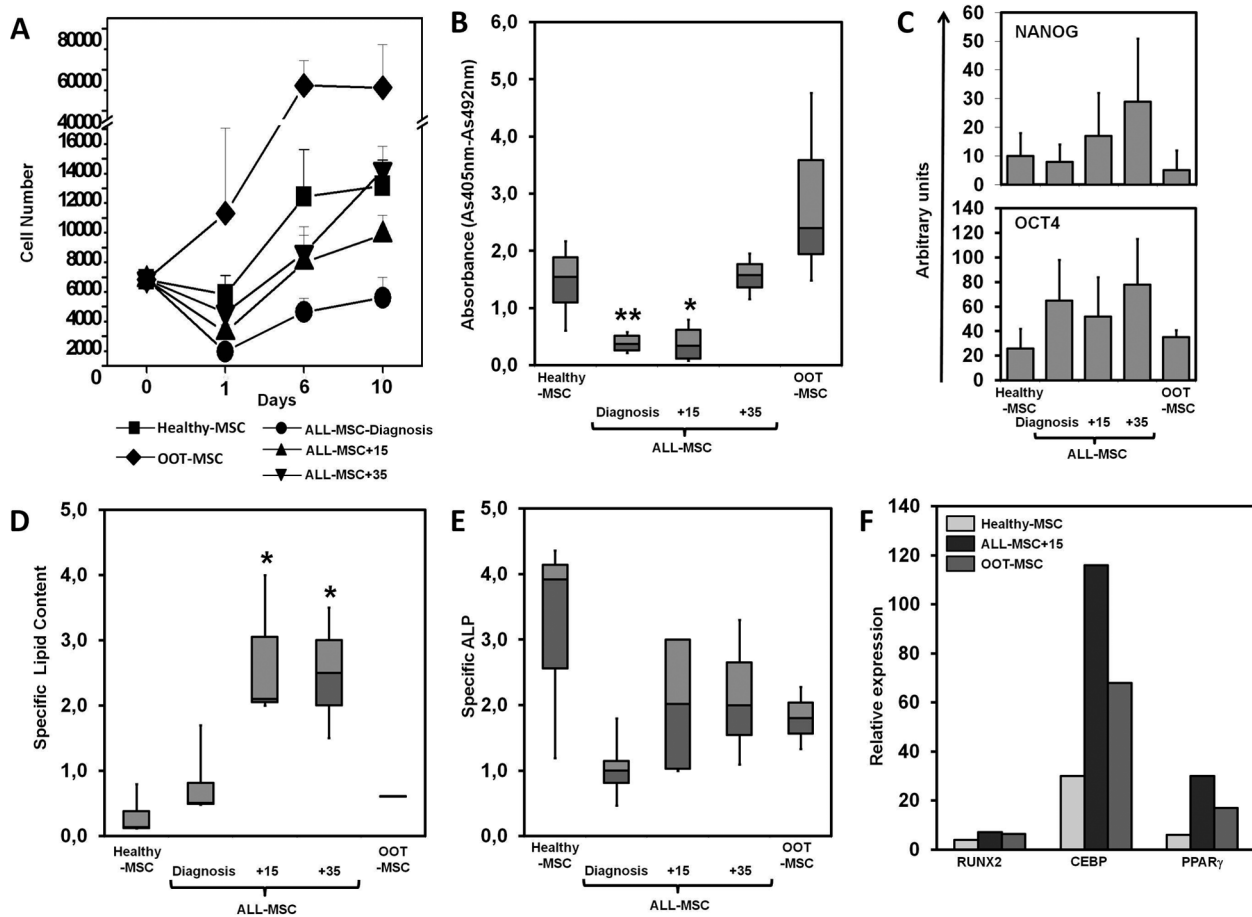
days of treatment (+35) showed low levels of BMP4, similar to Healthy-MSCs (Fig. 4A). The observed differences in BMP4 transcript production between Healthy-MSCs and ALL-MSCs were even more significant (Fig. 4B). ALL-MSCs at diagnosis showed 166-fold more BMP4 transcripts than Healthy-MSCs. These values gradually decreased in ALL-MSC+15 and ALL-MSC+35, but remained significantly higher than control values (Fig. 4B). In contrast, levels of BMP4 transcripts in MSCs obtained from patients out of therapy did not exhibit significant differences compared to Healthy-MSCs (Fig. 4B).

#### Expression of different members of the BMP4 signaling pathway in healthy and leukemic MSCs at different stages of disease

BMPs bind to three type I receptors (ACVR1, BMPR1A, and BMPR1B) and three type II receptors (BMPRII, ACVR2A, and ACVR2B). In our study, we focused on the type I receptors that show high affinity for the members of the BMP2/4 subgroup of BMPs [29]. In general, the expression of the three type I receptors was similar or lower in leukemic MSCs, including those from children out of therapy, but the differences were not significant (Fig. 5A).

After ligand binding a heterodimeric-activated receptor complex is formed, that phosphorylate R-SMADs, which then join to common SMAD4 and translocate into the nucleus where they affect ID genes [30]. Although a slight increase was detected in the expression of three R-SMADs in the leukemic cells at diagnosis, +15, +35 and out of therapy, the differences were not statistically significant. Remarkably, SMAD4 expression was significantly higher in MSCs obtained from BM of children after ending therapy compared to other MSC groups, including healthy ones (Fig. 5B). On the other hand, we were unable to find significant variations in the expression of the target transcription factors of BMP4, ID2 and ID3, between leukemic and Healthy-MSCs (Fig. 5C). ID2 expression was only significantly increased in ALL-MSC+15 (Fig. 5C).

Additionally, our results showed no changes in the expression of different BMP4 antagonists in ALL-MSCs compared to Healthy-



**Figure 2. Growth kinetics, proliferation and differentiation of ALL-MSCs.** (A) Growth kinetics of BM-MSCs. At each time point, cells were harvested, stained with trypan blue, and counted. Viable cells are represented. Data are representative results from at least, three independent experiments. (B) Determination of BM-MSC proliferation after culture for six days. Results are the mean of 11 different donors for ALL-MSCs and 6 different donors for Healthy-MSCs, each with three cultures per point. Asterisks indicate statistical significance between Healthy-MSC and ALL-MSC-Diagnosis or ALL-MSC+15 (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ). (C) Expression of transcription factors essential to the pluripotency and self-renewal properties of undifferentiated stem cells. MSCs cultured for six days were collected and the expression of NANOG and OCT4 was analyzed by quantitative PCR. No significant statistical differences were observed between Healthy-MSCs and ALL-MSCs. (D–F) Osteogenic and adipogenic differentiation capacity of Healthy-MSCs and ALL-MSCs. After six days of culture in Mesen PRO-RS<sup>TM</sup> medium, cells were transferred to either osteoblast- or adipocyte-inducing media for 15–20 more days. Adipogenic differentiation was evaluated by Oil Red O (ORO) staining of neutral lipids and Coomassie brilliant blue staining of cellular protein S. The specific lipid content was calculated as the absorbance ratio obtained by ORO and Coomassie blue staining. Osteogenic differentiation was evaluated as alkaline phosphatase (ALP) activity in 50  $\mu$ L of cell lysate and normalized for total protein to obtain the specific ALP. Asterisks indicate statistical significance between Healthy-MSC and ALL-MSC+15 or ALL-MSC+35 (\* $P < 0.05$ ) (Healthy-MSC,  $n = 6$ ; ALL-MSC,  $n = 11$ ; OOT-MSC,  $n = 3$ ). (F) After six days of culture in osteoblast- or adipocyte-inducing media, cells were collected and analyzed by quantitative PCR. Data show the induction of adipose (CEBP and PPAR $\gamma$ ) and osteogenic (RUNX2) specific genes in different MSC samples. doi:10.1371/journal.pone.0084496.g002

MSCs, except in the MSCs isolated from BM out of therapy, which exhibited significantly higher Noggin expression than any other MSC groups, including healthy controls (Fig. 5D).

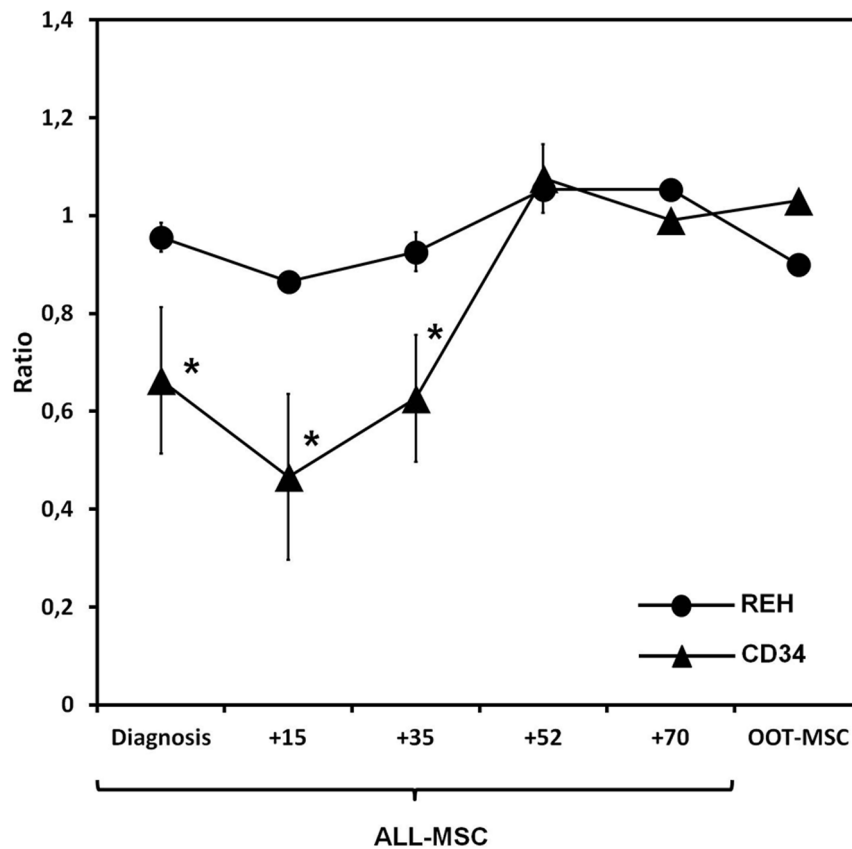
Furthermore, to determine whether the BMP signaling pathway was functional in ALL-MSCs, we stimulated healthy and ALL-MSCs with BMP4 and evaluated the phosphorylation of R-Smad1 by flow cytometry. Our results confirmed the normal functioning of the BMP signaling pathway in ALL-MSCs (Fig. 5E).

#### Response of healthy and leukemic MSC to BMP4 pathway

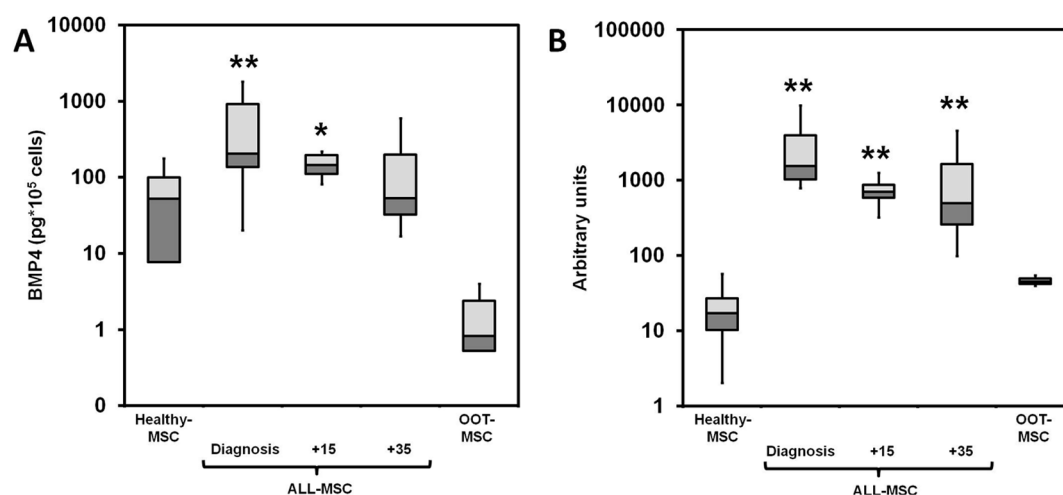
Treatment with different doses of dorsomorphin, an inhibitor of the canonical BMP signaling pathway, resulted in a significant concentration-dependent reduction of MSC proliferation that was greater in Healthy-MSCs than in ALL-MSCs (Fig. 6A). BMP4

supply to dorsomorphin-treated cultures restored cell proliferation to control levels, eliminating possible non-specific effects of the dorsomorphin treatment (Fig. 6A). At the same time, increased proportions of apoptotic Healthy-MSCs and ALL-MSCs were detected when cultured with dorsomorphin (Fig. 6B).

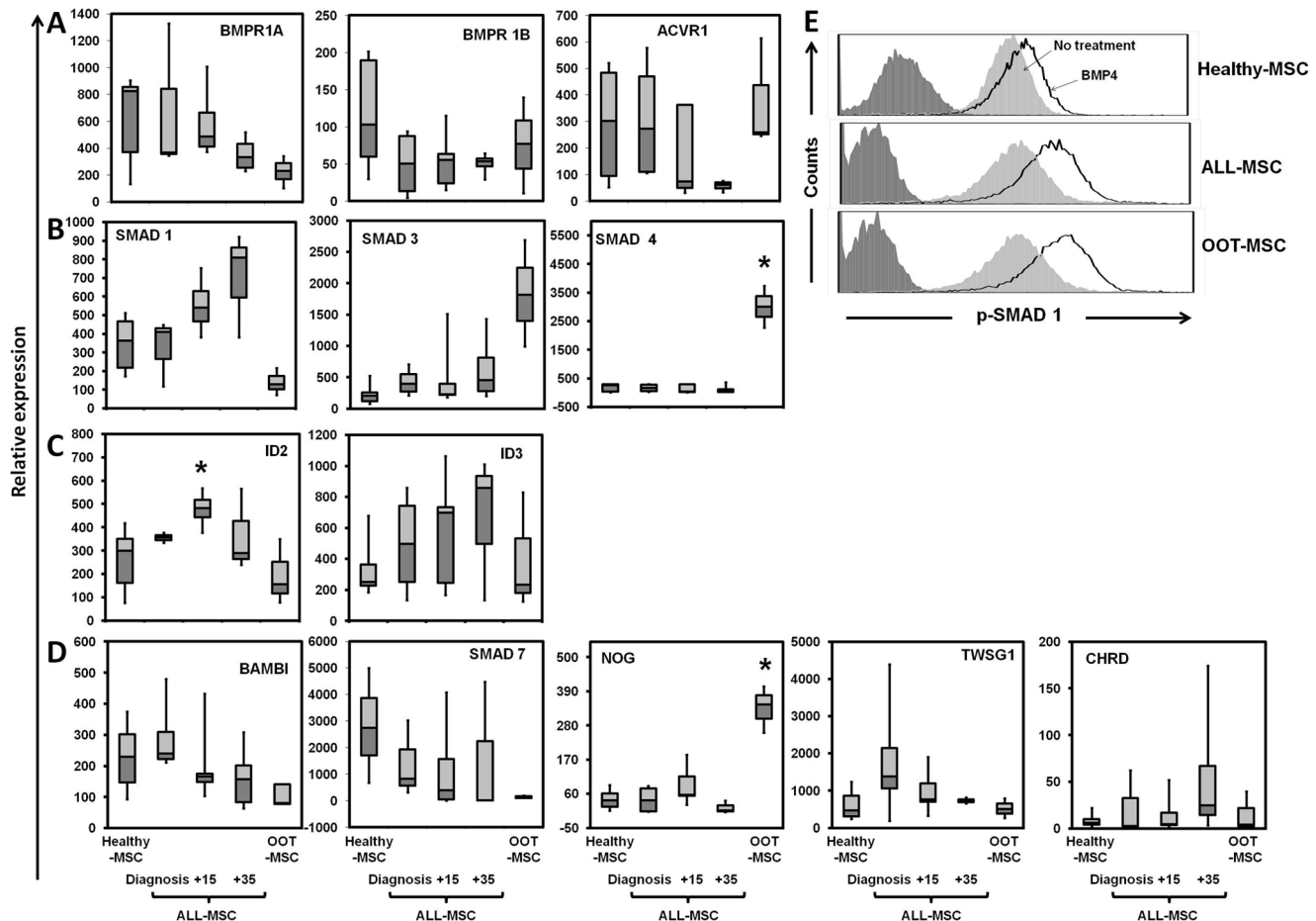
The addition of increasing doses of BMP4 induced a slight increase of healthy MSC proliferation compared to non-treated Healthy-MSCs, whereas high doses of BMP4 significantly reduced proliferation (Fig. 6C). Remarkably, when high doses of BMP4 were added to the Healthy-MSC cultures, the levels of MSC proliferation were equivalent to those observed in ALL-MSCs at diagnosis (Fig. 6C), when the highest amounts of BMP4 are produced (Fig. 4). Thus, when we represented together BMP4 production and MSC proliferation in ALL-MSCs along the course of disease, a correlation could be established between the high production of BMP4 and the low levels of MSC proliferation at



**Figure 3. Survival of cord blood CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells (REH cell-line) co-cultured with ALL-MSCs.** Cell survival is expressed as the ratio between the survival of CD45+ cells from co-cultures with ALL-MSCs and that from co-culture of either hematopoietic or leukemia cells with Healthy-MSCs. Values below 1 indicate that the viability of hematopoietic cells was lower when co-cultured with ALL-MSCs than when co-cultured with healthy BM-MSCs. Note the significant decrease of the survival of CD34+ hematopoietic progenitors co-cultured with ALL-MSCs at diagnosis and after +15 and +35 days of treatment. (\* $P \leq 0.05$ ). doi:10.1371/journal.pone.0084496.g003



**Figure 4. Expression of BMP4 by ALL-MSCs in the course of disease.** (A) MSCs isolated from the BM of healthy donors ( $n=6$ ) and ALL patients at different times in the course of disease ( $n=11$  patients and  $n=3$  children out of therapy) were cultured for six days, and the amount of BMP4 in the medium was assessed by ELISA. (B) BMP4 transcript expression in Healthy-MSCs and ALL-MSCs was confirmed by quantitative PCR. Data represent arbitrary units of gene expression from the different samples studied. Asterisks indicate statistical significance between Healthy-MSCs and ALL-MSCs (\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ ). doi:10.1371/journal.pone.0084496.g004



diagnosis, followed by a gradual decrease of BMP4 production during treatment (+15, +35) that correlated with increased rates of cell proliferation (Fig. 6D). On the other hand, none of the BMP4 doses significantly modified Healthy-MSC viability (Fig. 6E).

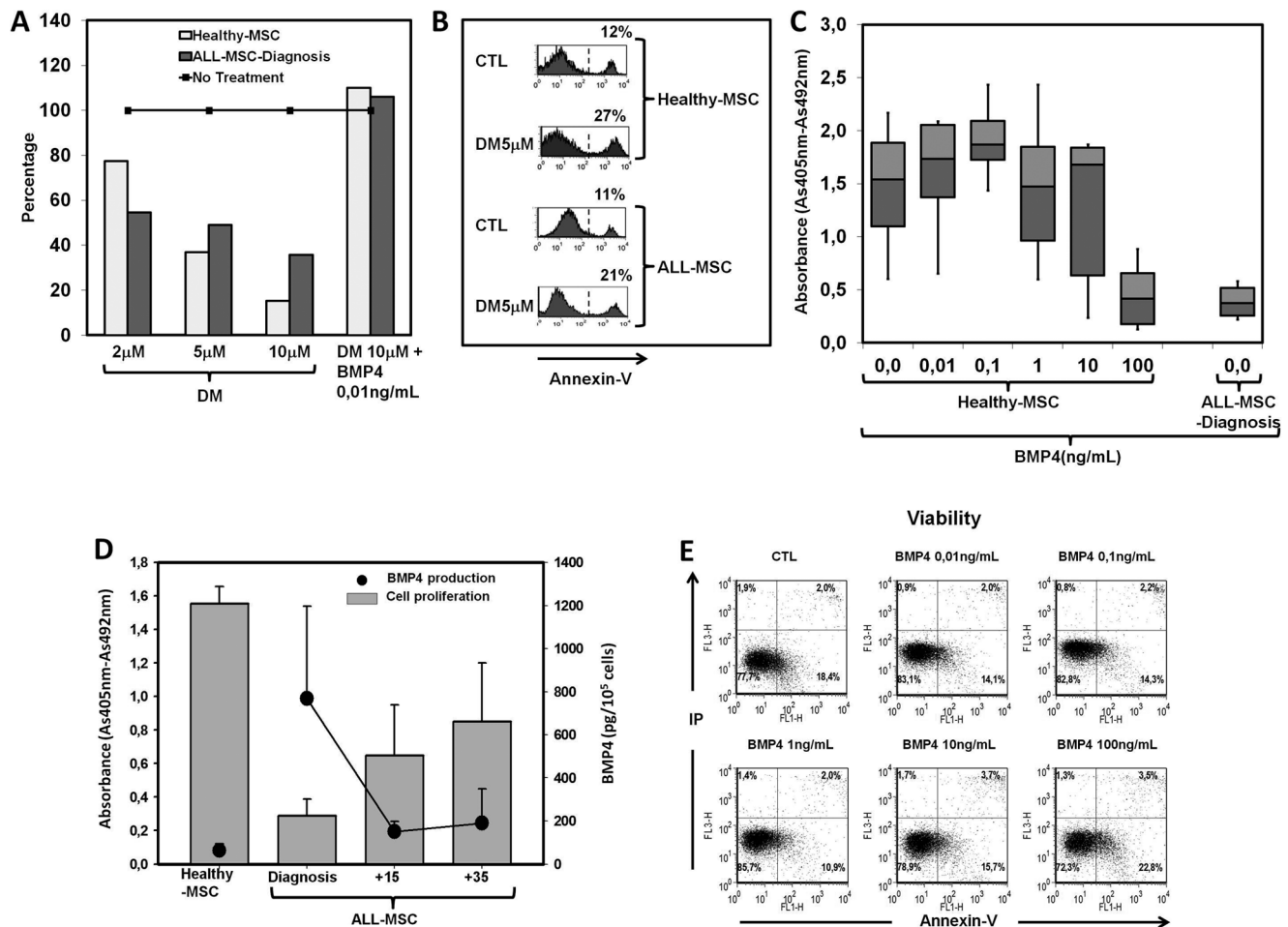
#### BMP4 production in co-cultures of healthy and leukemic MSC with either cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells or REH leukemia cell line

Because a crosstalk between stroma (MSCs) and hematopoietic cells has been established, we evaluated the effect of the presence of hematopoietic progenitors or leukemic cells (REH cell line) on BMP4 production by Healthy-MSCs or ALL-MSCs. When co-cultures were established between healthy or leukemic MSCs and CD34+ hematopoietic cells, although the basal BMP4 production of ALL-MSCs alone was significantly higher ( $767 \text{ pg} \pm 480$ ) than that of Healthy-MSCs ( $62 \text{ pg} \pm 42$ ) (Fig. 7A, dotted line), the presence of hematopoietic progenitors further stimulated production in the co-cultures established with Healthy-MSCs than in those with ALL-MSCs. However, co-cultures established with the REH cell line plus ALL-MSCs, but not with Healthy-MSCs, dramatically increased BMP4 production (Fig. 7A).

To analyze possible effects of this increased production of BMP4 by ALL-MSCs on the growth of either healthy or leukemic hematopoietic cells, we studied the proliferative capacity and viability in different leukemic cell lines and healthy hematopoietic cells, cultured alone without MSC, in the presence of high and low amounts of BMP4. No changes were observed in the proliferation rate in cultures supplied with low doses of BMP4. In contrast, high doses induced a slight decrease of the percentage of proliferating cells that was significant in the case of both REH cells and NALM6 cells (Fig. 7B) and in correlation, the absolute numbers obtained in these cultures were also reduced (Fig. 7C). BMP4 treatment did not significantly affect the proportions of apoptotic REH and NALM6 leukemic cells (Fig. 7D).

#### Discussion

ALL-MSCs do not show phenotypic changes compared to healthy BM-MSCs but their capacity to differentiate to adipocytes increases during the course of disease, later partially regressing in MSCs derived from patients who ended the therapy. Presumably, the chemotherapy treatments affect the behaviour of MSCs increasing their capacities for adipogenic differentiation because



**Figure 6. Relevance of BMP4 signaling in proliferation and viability in ALL-MSCs.** (A) Effects of different doses of dorsomorphin, an inhibitor of the canonical BMP signaling pathway, on the viability and proliferation of Healthy-MSCs and ALL-MSCs. BM-MSCs were cultured for six days in Mesen PRO-RS<sup>TM</sup> medium alone (no treatment) or containing different doses of dorsomorphin. Cultures treated with dorsomorphin 10 μM were supplied with 0.01 ng/mL BMP4 to avoid non-specific effects of the drug. Data represent the percentage of proliferation of treated Healthy-MSC or ALL-MSC-Diagnosis cultures with respect to that of non-treated ones in five independent experiments. (B) Annexin V staining was measured by flow cytometry in Healthy-MSC and ALL-MSC-Diagnosis cells harvested from control and dorsomorphin-treated cultures on day 6. The percentages of Annexin V+ cells in the iodide-negative population are indicated in each histogram. Data are representative of three independent results. (C) Cell proliferation measured as BrdU incorporation in newly synthesized ADN of Healthy-MSCs cultured for six days in the presence of increasing concentrations of BMP4. Note the low proliferation in cultures treated with high doses of BMP4 (100 ng/mL) and its similarity to that found in non-treated cultures of ALL-MSC-Diagnosis endogenously producing high amounts of the morphogen. Data represent the mean ± SD of five independent experiments, each with three cultures per time point. (D) Correlations between the proliferative rate of Healthy-MSCs and ALL-MSCs at different times in the course of disease and BMP4 production assessed in the 6 day culture supernatants. Note the gradual increase of MSC proliferation in correlation with the decreased production of BMP4. (E) Viability of Healthy-MSCs treated six days with different doses of BMP4 analyzed by Annexin V and propidium iodide staining. Results are representative of three independent experiments.

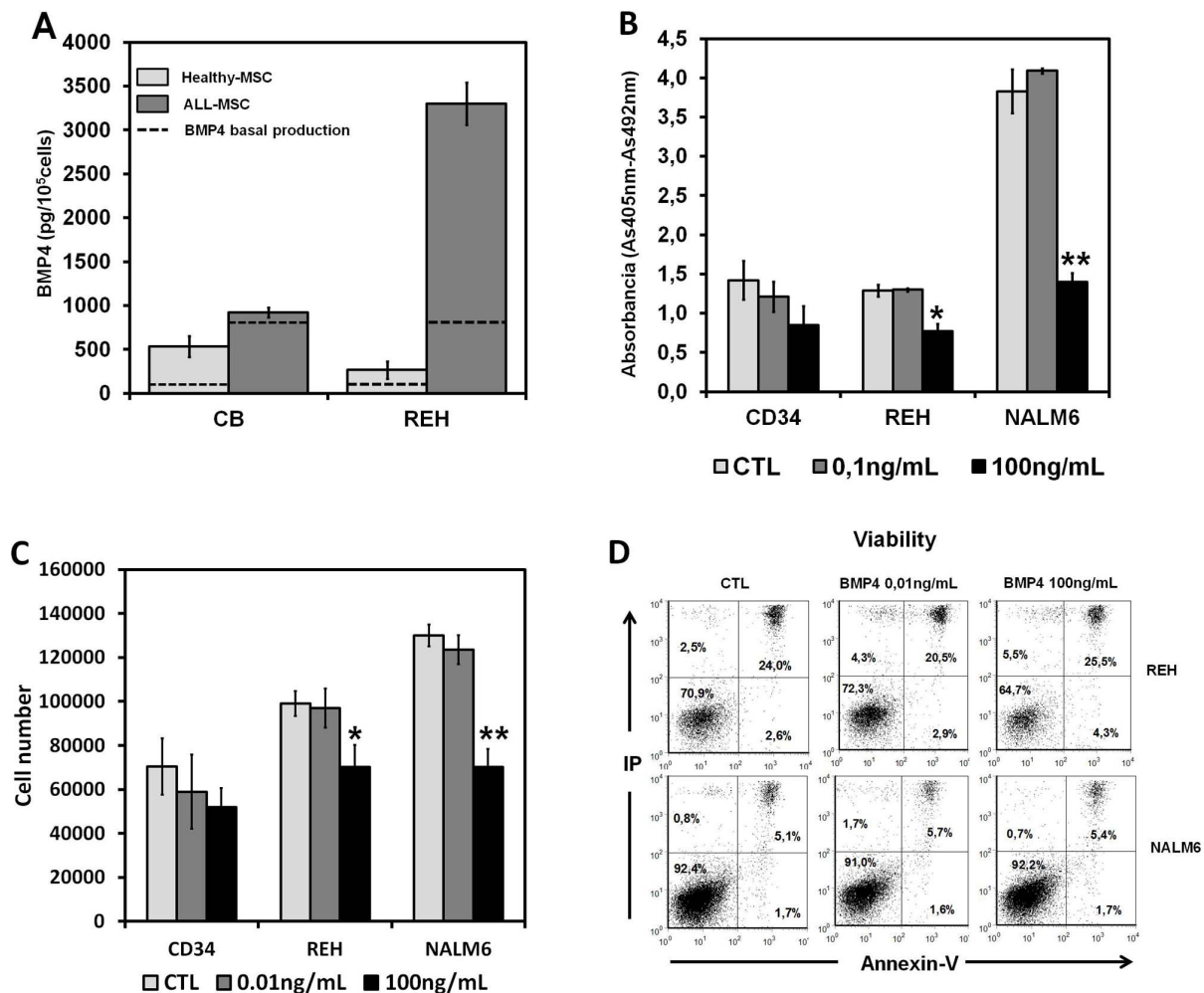
doi:10.1371/journal.pone.0084496.g006

cells derived from bone marrow of patients without treatment (at diagnosis and out of treatment) exhibited the same capacity than those derived from healthy donors. Other authors have reported that BMP4 is involved in MSC commitment into adipocytes [31] in a process in which FAK (focal adhesion kinase) plays an important role [32]. However, in MSC derived from ALL treated patients other factors apart from BMP4 production should be involved because ALL-MSC at different stages of disease produce similar amounts of BMP4 (Fig 4A and 4B) but exhibit different adipogenic capacities. In addition, their pattern of growth and proliferative capacities are altered during the disease. In general, no phenotypic changes have been reported in MSCs isolated from patients with haematological malignancies [33,34]. Nevertheless, some studies reported decreased expression of some markers

[35,36]. Data in the literature are also contradictory with respect to differentiation capacities: some studies have reported normal osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiating potential in leukemic MSCs [34], whereas others have shown impaired chondrogenesis or adipogenesis [33,37]. Different protocols for evaluating the differentiating properties of MSC could explain these different results.

Remarkably, our results demonstrate changes in growth and proliferation of MSCs during the course of the disease and after complete remission, which presumably correlated with the altered production of BMP4 by BM-MSCs isolated from patients in distinct stages of the disease. In this regard, a significant decrease was detected in MSC proliferation in samples obtained at diagnosis or after 15 days of treatment, whereas ALL-MSC+35





**Figure 7. Leukemic cells induce BMP4 production by ALL-MSCs and are differentially affected by the morphogen.** (A) BMP4 production was determined by ELISA assays in supernatants of 24 hours from BM-MSCs cultured alone or either with cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells or pre-B ALL cell line, REH. BMP4 basal production (dotted line) in Healthy-MSCs (gray) and ALL-MSCs (dark gray) (ALL-MSC-Diagnosis) cultures increased after co-culture with cord blood CD34+ hematopoietic progenitors or with REH cells, respectively, but not when healthy progenitors were co-cultured with ALL-MSCs or REH cells with Healthy-MSCs. Data represent the mean  $\pm$ SD of three experiments for each group. (B) Proliferative rate of different leukemic cell lines and cord blood CD34+ cells cultured without MSCs in the presence of distinct doses of BMP4. The figure shows BrdU incorporation after six days of culture (\* $P \leq 0.05$ ). (C). Proliferation of different leukemic cells lines and cord blood CD34+ cells, cultured without MSC in the presence of distinct doses of BMP4. The figure shows cell numbers after culture. Results are the mean of three experiments. Asterisks indicate statistical significance (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ). (D) Percentages of apoptotic cells in both REH and NALM6 leukemic cell lines in the presence of different doses of BMP4.  
doi:10.1371/journal.pone.0084496.g007

reached healthy values on day 10 of culture, and MSCs from patients free of therapy grow more than the Healthy-MSCs, perhaps reflecting a rebound effect after the end of treatment. In agreement, other authors have reported defective proliferation capacity of MSCs derived from leukemia and myelodysplastic syndrome patients [34,37].

Many molecules affect the biology of MSCs and some appear to be altered in different pathologies, but it is difficult to establish a comprehensive notion of their true role. Our results show a significant increase in BMP4 production by MSCs from patients at diagnosis that gradually decreases during treatment, and in MSCs derived from patients who had ended treatment. BMP4, a member of the TGF $\beta$  superfamily that regulates cellular survival, proliferation and differentiation as well as cell fate determination [38], has been reported as critical for the normal hematopoietic microenvironment [13,39]. BMP was also shown to be involved in

numerous hematopoietic neoplasias [12,40] and other non-haematological tumours [20,21,22,41]. Although high doses of BMP4 reduce proliferation of some leukemia cell lines, the effects of BMP4 could be mainly mediated by the stroma components [42] rather than directly on hematopoietic cells. We and other authors have previously demonstrated effects on the MSC biology of healthy donors [17,43], and primary and immortalized cell lines derived from human BM stroma inhibit the proliferation of ALL cell lines in a process blocked by Noggin, a BMP antagonist [11].

However our results did not detect significant modifications in the expression of BMP signaling pathway components. This could reflect the high variability detected among samples, probably due of differences in features in the group of patients such as age, sex, cytogenetic characteristics or level of risk of disease. Furthermore, the lack of changes in the BMP4 canonical pathway does not exclude the activation of other intimately associated intracellular

pathways, particularly in the case of MSCs derived from individuals who had finished therapy. In this group, co-SMAD4 expression was increased but not expression of BR-SMADs 1, 5 and 8. However, SMAD3, which is principally activated by activin and TGF $\beta$  rather than BMP4, also increases. In children out of therapy, this canonical signaling pathway could have been activated by other ligands. In addition, MSCs derived from children after finishing therapy show increased Noggin expression that could be antagonizing BMP4 effects and promoting disease relapse. Alternatively, this increase may reflect the recovery of a marrow free of leukemia after months of chemotherapy. Nevertheless, it is a speculative explanation that needs further confirmation.

The involvement of BMP4 in the altered behaviour of leukemia MSC is evidenced also by the responses observed to the different doses of the morphogen and to the blockade of the signaling pathway. As observed in human adipose stem cell cultures [17], treatment with the BMP inhibitor dorsomorphin resulted in a dose-dependent decrease in cell proliferation that was greater in healthy MSCs compared to leukemia MSCs, even when high doses of dorsomorphin were used. This finding is presumably related to the higher production of BMP4 found in leukemia MSCs, compared to that of healthy cultures. More remarkable are the results obtained after healthy MSCs cultures were treated with different doses of BMP4. In agreement with our previous results [17], MSCs derived from normal BM showed decreased proliferation and viability when high concentrations of BMP4 were added to the cultures. Other results support this relationship between BMPs and MSC behaviour. Thus, the Noggin-dependent decreased endogenous production of BMP reduces the human BM-MSC survival [43] and high doses of BMP2 reduce MSC growth [44]. Accordingly, MSCs derived from ALL patients at diagnosis that produce endogenously high amounts of BMP4 exhibit low levels of proliferation that gradually increase during treatment in correlation with decreased BMP4 production.

We also analyzed the relevance of leukemia cells for BMP4 production by MSCs. Remarkably, whereas normal CD34+ hematopoietic progenitors favoured the BMP4 production by Healthy-MSCs but hardly affected that of ALL-MSCs, the co-culture of ALL-MSCs with the ALL REH cell line amplified their BMP4 production. Hence, our results support a true crosstalk between ALL cells and the altered BM microenvironment. ALL cells could “hijack” the homeostatic mechanisms that govern the BM hematopoietic microenvironment, as previously proposed by other authors [3]. Underlying mechanisms that govern the effects of leukemia cells on BMP4 genes in BM-MSCs are still unknown, although some ideas can be proposed. Sonic hedgehog (SHH)

proteins could be key in this activation. Paracrine requirement for Shh signaling is observed in B-cell malignancies and other cancers [45,46,47]. Different BMPs and SHH proteins participate in the control and differentiation of human hematopoietic precursor cells, together with several cytokines [39,48,49,50]. BMPs mediate SHH activity in many systems during organogenesis and in adult life. BMP4 acts as a downstream mediator of SHH-dependent effects on intrathymic CD34+ precursor cells, whereas SHH up regulates BMP receptor expression and induces autocrine BMP4 secretion on CD34+ cells. In addition, Noggin reverses the inhibition of CD34+ cell proliferation induced by Shh [51]. Other cytokines, such as IL3, IL6, FLT3 ligand, SCF and G-CSF, up regulate BMP4 expression in human cord blood CD34+ CD38- precursor cells [42] and the combination of IFN- $\gamma$ , IL17, TNF- $\alpha$  and TGF $\beta$  strongly induces the production of BMP2 by human MSCs [52].

How the altered behaviour of ALL-MSCs could affect the biology of leukemic and hematopoietic cells; and whether those presumptive effects are mediated through the high production of BMP4 found in ALL-MSC cultures remain unknown. ALL-MSC-Diagnosis decreases the survival of healthy hematopoietic progenitors compared to that observed in co-cultures with BM-MSC from healthy donors, but does not substantially modify survival of leukemic cells. Other studies have reported impaired haematopoiesis in the presence of MSCs derived from patients suffering distinct haematological syndromes [37,53] and the occurrence of leukemia cells in the BM disrupts hematopoietic stroma causing abnormal behaviour of healthy hematopoietic progenitors [3].

Furthermore, we demonstrate that high levels of BMP4 reduce, although not significantly, the proliferation of healthy hematopoietic progenitors, but particularly that of the leukemic REH and NALM6 cell lines. Presumably, in the microenvironment of a bone marrow homed by leukemic cells, high production of BMP4 could directly affect the ALL-MSCs and then indirectly the hematopoietic progenitors. Thus, decreased survival of healthy CD34+ progenitor cells occurs in co-cultures with ALL-MSCs that exhibit a high capacity to differentiate to adipocytes. Remarkably, MSCs that undergo adipogenic differentiation protect acute myeloid leukaemia from retinoid acid-induced death [54] but adipocytes negatively affect normal haematopoiesis in the BM [55].

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AGZG AVL MNVG JGC MRO. Performed the experiments: MNVG GJM AEM ICMs. Analyzed the data: AVL MNVG JGC MRO AGZG AEM ICM. Wrote the paper: AGZG AVL MNVG JGC MRO.

## References

- Konopleva MY, Jordan CT (2011) Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *J Clin Oncol* 29: 591–599.
- Lane SW, Scadden DT, Gilliland DG (2009) The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood* 114: 1150–1157.
- Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, et al. (2008) Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* 322: 1861–1865.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, et al. (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131: 324–336.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3: 393–403.
- Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641–650.
- Manabe A, Coustan-Smith E, Behm FG, Raimondi SC, Campana D (1992) Bone marrow-derived stromal cells prevent apoptotic cell death in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 79: 2370–2377.
- Mudry RE, Fortney JE, York T, Hall BM, Gibson LF (2000) Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 96: 1926–1932.
- Juarez J, Baraz R, Gaundar S, Bradstock K, Bendall L (2007) Interaction of interleukin-7 and interleukin-3 with the CXCL12-induced proliferation of B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 92: 450–459.
- Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Cote D, et al. (2005) In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 435: 969–973.
- Dosen-Dahl G, Munthe E, Nygren MK, Stubberud H, Hystad ME, et al. (2008) Bone marrow stroma cells regulate TIEG1 expression in acute lymphoblastic leukemia cells: role of TGF $\beta$ /BMP-6 and TIEG1 in chemotherapy escape. *Int J Cancer* 123: 2759–2766.
- Detmer K, Steele TA, Shoop MA, Dannawi H (1999) Lineage-restricted expression of bone morphogenetic protein genes in human hematopoietic cell lines. *Blood Cells Mol Dis* 25: 310–323.
- Goldman DC, Bailey AS, Pfaffle DL, Al Masri A, Christian JL, et al. (2009) BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 114: 4393–4401.

14. Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 99: 2179–2184.
15. Kersten C, Dosen G, Myklebust JH, Sivertsen EA, Hystad ME, et al. (2006) BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis-upregulation of Id1 and Id3. *Exp Hematol* 34: 72–81.
16. Khurana S, Buckley S, Schouteden S, Ekker S, Petryk A, et al. (2013) A novel role of BMP4 in adult hematopoietic stem and progenitor cell homing via Smad independent regulation of integrin- $\alpha$ 4 expression. *Blood* 121: 781–790.
17. Vicente Lopez MA, Vazquez Garcia MN, Entrena A, Olmedillas Lopez S, Garcia-Arranz M, et al. (2011) Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency. *Stem Cells Dev* 20: 1011–1019.
18. Kallioniemi A (2012) Bone morphogenetic protein 4—a fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer Genet* 205: 267–277.
19. Laperrousaz B, Jeanpierre S, Sagorny K, Voeltzel T, Ramas S, et al. (2013) Primitive CML cell expansion relies on abnormal levels of BMPs provided by the niche and BMPRIb overexpression. *Blood* 10.1182/blood-2013-05-501460.
20. Fong YC, Li TM, Wu CM, Hsu SF, Kao ST, et al. (2008) BMP-2 increases migration of human chondrosarcoma cells via PI3K/Akt pathway. *J Cell Physiol* 217: 846–855.
21. Le Page C, Puiff ML, Meunier L, Zietarska M, de Ladurantaye M, et al. (2009) BMP-2 signaling in ovarian cancer and its association with poor prognosis. *J Ovarian Res* 2: 4.
22. McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, et al. (2011) Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest* 121: 3206–3219.
23. Ortega JJ, Ribera JM, Oriol A, Bastida P, Gonzalez ME, et al. (2001) Early and delayed consolidation chemotherapy significantly improves the outcome of children with intermediate risk acute lymphoblastic leukemia. Final results of the prospective randomized PETHEMA ALL-89 TRIAL. *Haematologica* 86: 586–595.
24. Martinez-Laperche C, Gomez-Garcia AM, Lassaletta A, Moscardo C, Vivanco JL, et al. (2013) Detection of occult cerebrospinal fluid involvement during maintenance therapy identifies a group of children with acute lymphoblastic leukemia at high risk for relapse. *Am J Hematol* 88: 359–364.
25. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147.
26. Bouraoui L, Gutierrez J, Navarro I (2008) Regulation of proliferation and differentiation of adipocyte precursor cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Endocrinol* 198: 459–469.
27. Schindeler A, Little DG (2005) Osteoclasts but not osteoblasts are affected by a calcified surface treated with zoledronic acid in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 710–716.
28. Ramasamy R, Lam EW, Socero I, Tisato V, Bonnet D, et al. (2007) Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* 21: 304–310.
29. Sebal W, Nickel J, Zhang JL, Mueller TD (2004) Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol Chem* 385: 697–710.
30. Guo J, Wu G (2012) The signaling and functions of heterodimeric bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 23: 61–67.
31. Schulz TJ, Tseng YH (2009) Emerging role of bone morphogenetic proteins in adipogenesis and energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 523–531.
32. Lee JS, Ha L, Kwon IK, Lim JY (2013) The role of focal adhesion kinase in BMP4 induction of mesenchymal stem cell adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 435: 696–701.
33. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Flores-Guzman P, Gutierrez-Espindola G, Arana-Trejo RM, et al. (2008) Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Res* 32: 1407–1416.
34. Klaus M, Stavroulaki E, Kastrinaki MC, Fragioudaki P, Giannikou K, et al. (2010) Reserves, functional, immunoregulatory, and cytogenetic properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes. *Stem Cells Dev* 19: 1043–1054.
35. Campioni D, Moretti S, Ferrari L, Punturieri M, Castoldi GL, et al. (2006) Immunophenotypic heterogeneity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with hematologic disorders: correlation with bone marrow microenvironment. *Haematologica* 91: 364–368.
36. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, Robledo C, Villaron EM, et al. (2009) Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q-syndrome. *Leukemia* 23: 664–672.
37. Zhao ZG, Liang Y, Li K, Li WM, Li QB, et al. (2007) Phenotypic and functional comparison of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow of normal adults and patients with hematologic malignant diseases. *Stem Cells Dev* 16: 637–648.
38. Chen D, Zhao M, Harris SE, Mi Z (2004) Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci* 9: 349–358.
39. Detmer K, Walker AN (2002) Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. *Cytokine* 17: 36–42.
40. Mesa RA, Li CY, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, et al. (2005) Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood* 105: 973–977.
41. Kang Q, Song WX, Luo Q, Tang N, Luo J, et al. (2009) A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev* 18: 545–559.
42. Zhang J, Li L (2005) BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol* 284: 1–11.
43. Solmesky LJ, Abekasis M, Bulvik S, Weil M (2009) Bone morphogenetic protein signaling is involved in human mesenchymal stem cell survival in serum-free medium. *Stem Cells Dev* 18: 1283–1292.
44. Farre J, Roura S, Prat-Vidal C, Soler-Botija C, Llach A, et al. (2007) FGF-4 increases in vitro expansion rate of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Growth Factors* 25: 71–76.
45. Dierks C, Grbic J, Zirik K, Beigi R, Englund NP, et al. (2007) Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies. *Nat Med* 13: 944–951.
46. Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, Banerji SK, Ghosh R, et al. (2007) Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia* 21: 949–955.
47. Zhao C, Chen A, Jamieson CH, Fereshteh M, Abrahamsson A, et al. (2009) Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 458: 776–779.
48. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wraha J, et al. (1999) Bone Morphogenetic Proteins Regulate the Developmental Program of Human Hematopoietic Stem Cells *JEM* 189: 1139–1148.
49. Grassinger J, Simon M, Mueller G, Drewel D, Andreesen R, et al. (2007) Bone morphogenetic protein (BMP)-7 but not BMP-2 and BMP-4 improves maintenance of primitive peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells (HPC) cultured in serum-free medium supplemented with early acting cytokines. *Cytokine* 40: 165–171.
50. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, et al. (2001) Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2: 172–180.
51. Varas A, Sacedon R, Hidalgo L, Martinez VG, Valencia J, et al. (2009) Interplay between BMP4 and IL-7 in human intrathymic precursor cells. *Cell Cycle* 8: 4119–4126.
52. Rifas L (2006) T-cell cytokine induction of BMP-2 regulates human mesenchymal stromal cell differentiation and mineralization. *J Cell Biochem* 98: 706–714.
53. Varga G, Kiss J, Varkonyi J, Vas V, Farkas P, et al. (2007) Inappropriate Notch activity and limited mesenchymal stem cell plasticity in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Pathol Oncol Res* 13: 311–319.
54. Tabe Y, Konopleva M, Munsell MF, Marini FC, Zompetta C, et al. (2004) PML-RAR $\alpha$  is associated with leptin-receptor induction: the role of mesenchymal stem cell-derived adipocytes in APL cell survival. *Blood* 103: 1815–1822.
55. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, et al. (2009) Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460: 259–263.



# Low Doses of Bone Morphogenetic Protein 4 Increase the Survival of Human Adipose-Derived Stem Cells Maintaining Their Stemness and Multipotency

María A. Vicente López,<sup>1,\*</sup> Miriam N. Vázquez García,<sup>1,\*</sup> Ana Entrena,<sup>1</sup> Susana Olmedillas Lopez,<sup>2</sup> Mariano García-Arranz,<sup>2</sup> Damián García-Olmo,<sup>3</sup> and Agustín Zapata<sup>4</sup>

Mesenchymal stem cells (MSCs) have emerged as important tools for cell therapy; therefore, identification of factors capable of governing their ex vivo expansion become essential. In this study we demonstrate that human adipose-derived stem cells (ASCs) express all components of the bone morphogenetic protein (BMP)/BMP receptor signaling pathway and respond to BMP4 inducing upregulated expression of its specific target genes *Id1–Id4*. Moreover, ASCs grown in a medium reduced in serum produce endogenous BMP4 that could affect autocrinely ASC growth. On the contrary, dorsomorphin, an inhibitor of BMP signaling pathway, decreases cell numbers yielded from ASC cultures in correlation with increased apoptosis and decreased cycling cells. Therefore, BMP4 emerges as a possible factor for ex vivo expanding human ASCs. Our results demonstrate that, as other morphogens, BMP4 effects on human MSCs are dose dependent. High doses significantly increased apoptosis and drastically reduced cell proliferation, whereas low doses of BMP4 (0.01–0.1 ng/mL) significantly increase culture cell content, reduce the number of apoptotic cells, and increase that of cycling cells. Further, treatment of human ASCs with low doses of BMP4 does not modify expression of *Nanog* and *Oct4*, two transcription factors involved in self-renewal and pluripotency of stem cells or avoid their osteogenic or osteoblastic differentiation capacities when cultured in adequate inducing media, as shown by the induction of specific gene expression (*CEBP*, *PPAR $\gamma$* , and *RUNX2*). Our results therefore support BMP4 as a promising factor for expanding human adipose tissue-derived MSCs maintaining their properties of stemness and multipotency.

## Introduction

MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) were initially described as a bone marrow-derived mononuclear cell fraction that, after culture ex vivo, adhered to plastic and acquired a fibroblast-like morphology [1]. These cells were distinct from hematopoietic stem cells and exhibited capacity to differentiate into multiple mesodermal cell lineages, largely to bone, cartilage, and adipocytes [2]. Apart from bone marrow, MSCs with similar biological properties, although slight phenotypic differences, have been isolated from numerous tissues, suggesting that they reside within the connective tissue of most organs [3]. Of special interest is the adipose tissue since it constitutes an abundant and easily accessible source of MSCs [4]. These stem cells have been variously termed, but a recent consensus has settled on the term “adipose-derived stem cells” (ASCs) [5].

However, a critical problem of MSCs is their limited ex vivo growth rate that makes mandatory their expansion in vitro to obtain a sufficient number of cells for cell therapy. Currently, MSCs destined for clinical therapy are expanded before transplantation in the culture medium supplemented with 10%–20% fetal bovine serum (FBS), increasing the potential risk of transferring animal proteins to human cells. To drastically reduce the animal-derived serum concentration or to use reagents of human origin become, therefore, critical issues for improving the therapeutical applications of MSCs. It is important to identify growth factors capable of inducing MSC expansion maintaining their properties of survival and multilineage differentiation capacities to an extensive therapeutic application of MSCs. In the last years, several factors, especially different members of transforming growth factor  $\beta$  superfamily, have been used with the proposal of increase in vitro the number of MSCs. Remarkably, MSCs survive at low density in the absence of serum [6], a phenomenon that has

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, School of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Cell Therapy Unit and <sup>3</sup>Surgery Department, La Paz University Hospital, Madrid, Spain.

<sup>4</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain.

\*These two authors contributed equally to this work.



## SHORT COMMUNICATION

# A discrete population of IFN $\lambda$ -expressing BDCA3<sup>hi</sup> dendritic cells is present in human thymus

Víctor G Martínez<sup>1</sup>, Noelia M Canseco<sup>1</sup>, Laura Hidalgo, Jaris Valencia, Ana Entrena, Lidia M Fernández-Sevilla, Carmen Hernández-López, Rosa Sacedón, Angeles Vicente<sup>1</sup> and Alberto Varas<sup>1</sup>

Human thymus contains two major subpopulations of dendritic cells (DCs), conventional DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs), which are mainly involved in central tolerance and also in protecting the thymus against infections. In blood and peripheral organs cDCs include the subpopulation of BDCA3<sup>hi</sup> DCs, considered as equivalents to mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs. In this study we describe in human thymus the presence of a discrete population of BDCA3<sup>hi</sup> DCs that, like their peripheral counterparts, express CD13, low-intermediate levels of CD11c, CLEC9A, high levels of XCR1, IRF8 and TLR3, and mostly lack the expression of CD11b, CD14 and TLR7. Thymic BDCA3<sup>hi</sup> DCs display immature features with a low expression of costimulatory molecules and HLA-DR, and a low allostimulatory capacity. Also, BDCA3<sup>hi</sup> DCs exhibit a strong response to TLR3 stimulation, producing high levels of interferon (IFN)- $\lambda$ 1 and CXCL10, which indicates that, similarly to thymic pDCs, BDCA3<sup>hi</sup> DCs can have an important role in thymus protection against viral infections.

*Immunology and Cell Biology* (2015) **00**, 1–6. doi:10.1038/icb.2015.22

Thymic dendritic cells (DCs) are highly specialized antigen-presenting cells with specific functions including induction of central tolerance through negative selection of self-reactive thymocytes and promotion of regulatory T (Treg) cell differentiation.<sup>1,2</sup> Plasmacytoid DCs (pDCs) and conventional DCs (cDCs) are the two major DC subpopulations described in human thymus.<sup>3–5</sup> Thymic pDCs are found in both the thymic cortex and the medulla and are phenotypically defined as HLA-DR<sup>int</sup> CD123<sup>hi</sup> CD45RA<sup>+</sup> cells lacking expression of CD13 and CD11c. They are considered as immature DCs owing to their low expression of costimulatory molecules that are strongly upregulated after activation.<sup>3–5</sup> A population of thymic mature activated pDCs has been recently described *ex vivo* and their involvement in Treg cell development has been demonstrated.<sup>6</sup> Like peripheral blood pDCs, thymic pDCs secrete interferon (IFN)- $\alpha$  in response to viruses indicating that these cells also have a role in protecting the thymus against viral infections.<sup>3,7</sup> Unlike pDCs, thymic cDCs are defined as HLA-DR<sup>+</sup> CD13<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> cells expressing CD45RO rather than CD45RA and are found mainly within the thymic medulla and at the corticomedullary border. They can be subdivided in two main subsets, immature and mature cDCs, based on the differential expression of HLA-DR and DC-LAMP,<sup>3</sup> CD11b<sup>5</sup> and CD14,<sup>4</sup> along with their expression of costimulatory molecules. Functionally, it is assumed that cDCs have an important role in the elimination of self-reactive thymocytes<sup>1,2</sup> and also thymic immature cDCs have been demonstrated to strongly induce the proliferation and differentiation of suppressive Treg cells after activation with Hassall's corpuscles-derived thymic stromal lymphopoietin (TSLP).<sup>8</sup>

In the periphery, cDCs can be separated into BDCA1<sup>+</sup> and BDCA3<sup>hi</sup> DCs,<sup>9–11</sup> and a recent comparative genomic analysis have indicated that human blood BDCA3<sup>hi</sup> DCs have a transcriptional signature that resembles that of mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs, suggesting that BDCA3<sup>hi</sup> DCs might be functionally related to this lineage.<sup>12</sup> The finding of the equivalence between CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> and human BDCA3<sup>hi</sup> DCs was supported by the identification of markers that are expressed on both DC subsets including CLEC9A/DNGR-1, XCR1, Necl2/CADM1 and TLR3, as well as the lack of expression of other markers such as CD11b and TLR7.<sup>13–15</sup> Although now controversial, the functional hallmarks of BDCA3<sup>hi</sup> DCs seem to be IL12p70 secretion, cross-presentation ability and mainly IFN- $\lambda$  production.<sup>15,16</sup> Apart from blood, BDCA3<sup>hi</sup> DCs have been also found in several peripheral organs, such as lung, liver and skin,<sup>9</sup> and lymphoid tissues including spleen, lymph nodes, tonsils and bone marrow.<sup>11,14,17</sup> However no study has yet analyzed the existence of BDCA3<sup>hi</sup> DCs in human thymus, although Vandenabeele *et al.*<sup>5</sup> indicated that the thymic CD11b<sup>−</sup> DC subpopulation had similarities to murine CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs, the major DC subpopulation appearing in mouse thymus.<sup>1</sup> In the current study we describe in the human thymus a population of BDCA3<sup>hi</sup> DCs showing remarkable similarities with BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> DCs present in human peripheral organs. We also show that thymic BDCA3<sup>hi</sup> DCs highly produce IFN- $\lambda$  in response to TLR3 stimulation suggesting that they can share with thymic pDCs the role of protecting the thymus gland against microbial infections.

Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

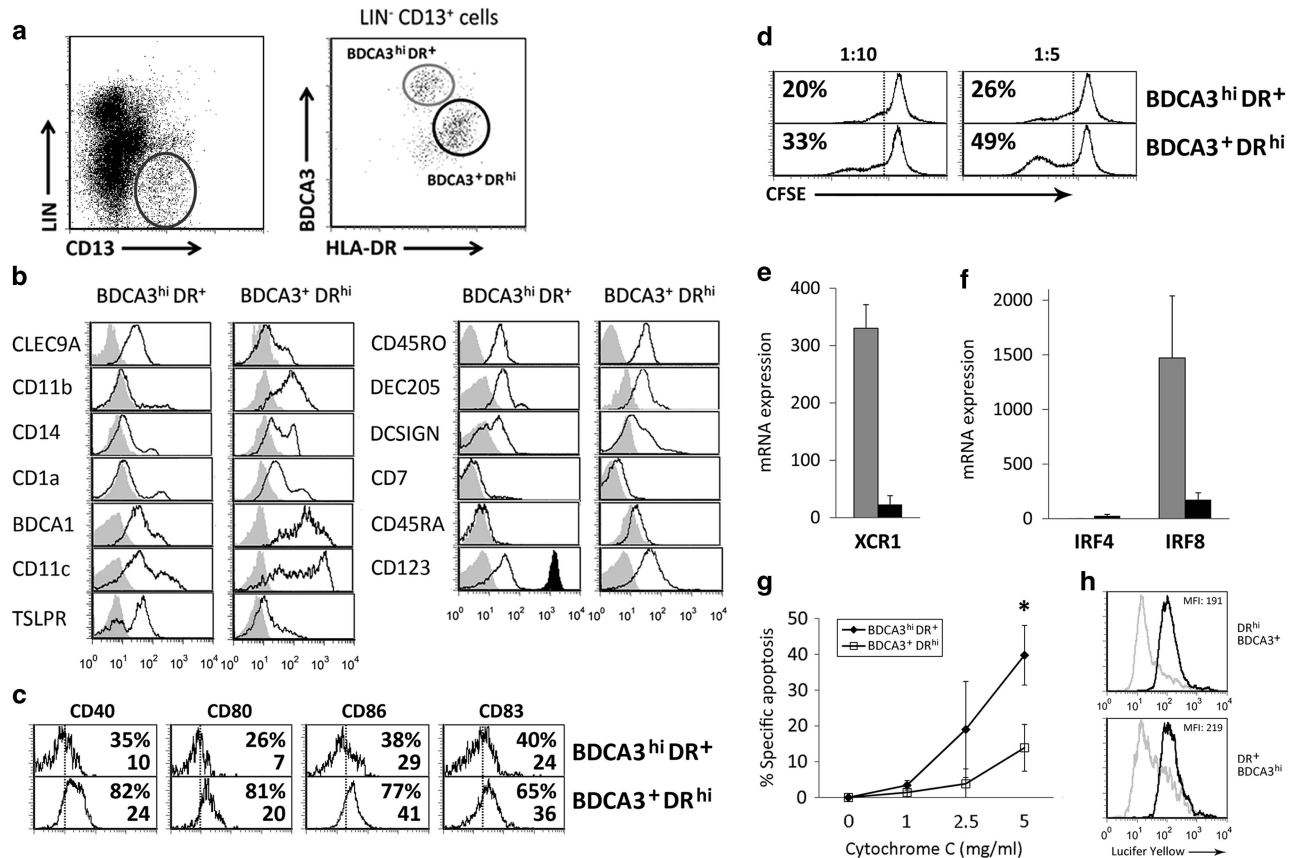
<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Dr A Varas, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid 28040, Spain.

E-mail: avaras@ucm.es

Received 16 September 2014; revised 19 January 2015; accepted 1 February 2015





**Figure 1** Phenotypic and functional analysis of BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> human thymic DC subsets. (a) Thymocyte suspensions were enriched in non-T cells and among the Lin<sup>-</sup> (CD34, CD3, CD56, CD19) CD13<sup>+</sup> cells two different DC subpopulations were found according to their BDCA3 and HLA-DR expression. (b) Differential expression of several cell markers in BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> DC subsets. Light-gray filled histograms represent background fluorescence. For comparison, the black-filled histogram shows the high expression of CD123 exhibited by thymic pDCs. Similar staining patterns were obtained in two to eight different experiments. (c) BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> DCs were analyzed for the expression of costimulatory molecules (CD40, CD80 and CD86) and CD83. Dotted lines represent the fluorescence background. Percentages of positive cells and mean fluorescence intensities are indicated in each histogram. (d) cDC subsets were isolated from human thymus and co-cultured with CFSE-stained naive CD4<sup>+</sup> T cells at different DC:T cell ratios. After 6 days of culture cell proliferation was assessed by flow cytometry. Data are representative of two to three independent experiments. (e,f) BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> DCs were isolated and mRNA levels for XCR1 (e), IRF4 and IRF8 (f) were determined by quantitative RT-PCR. Results represent the mean ( $\pm$  s.d.) of four samples pooled from two independent experiments. GNB2L1 was used as endogenous control. (g) Thymocyte suspensions were cultured with horse heart cytochrome C or vehicle for 24 h and the percentage of specific apoptosis was calculated as described in methods. The mean ( $\pm$  s.d.) of three samples is shown (\* $P$  < 0.05, by  $t$ -test). (h) Internalization of Lucifer Yellow was analyzed after 4 h of incubation at 37 °C (black histograms) or 4 °C (gray histograms). One representative out of three independent experiments is shown.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Human thymus contains a population of BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> XCR1<sup>+</sup> dendritic cells

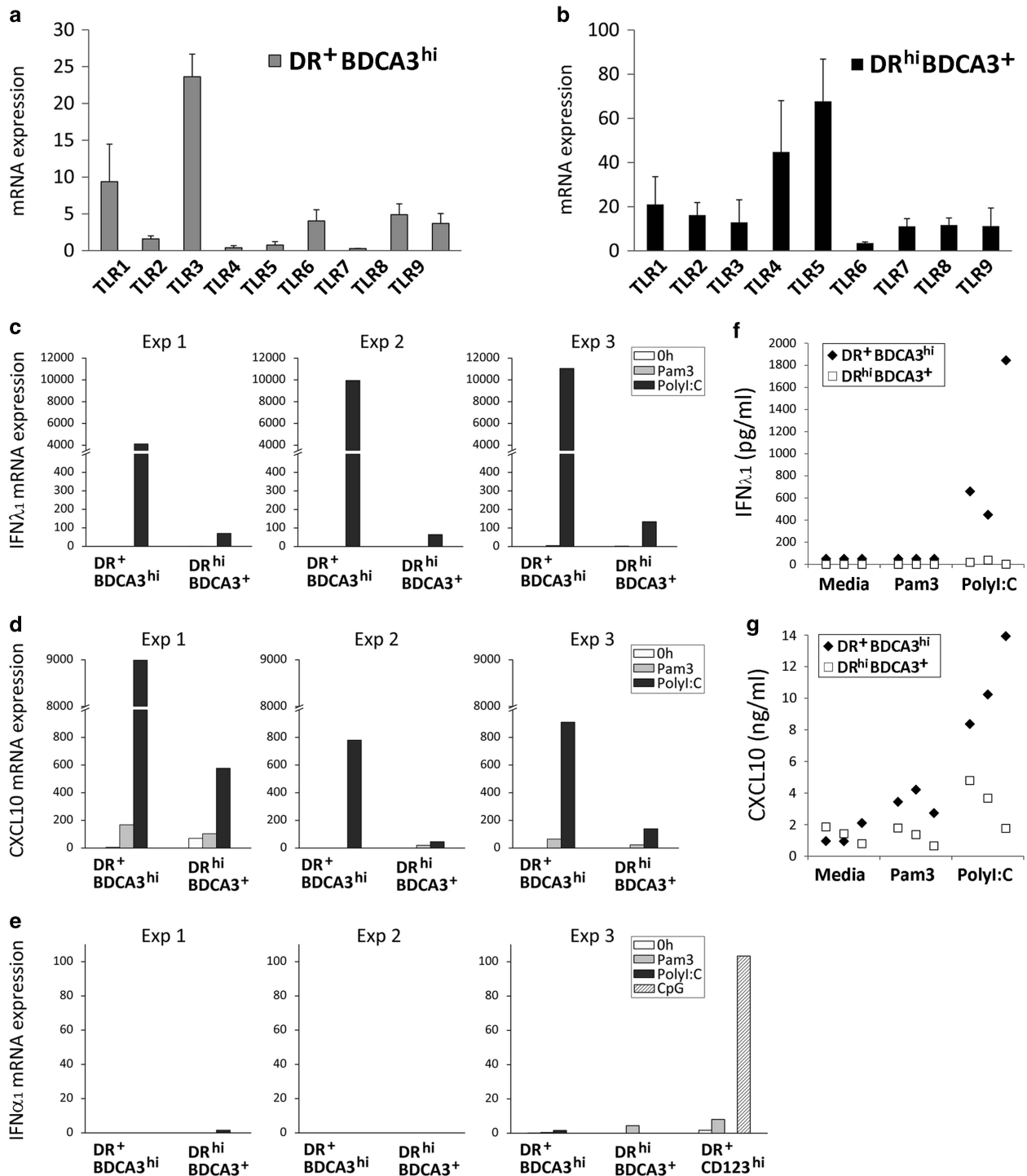
The analysis of BDCA3 expression in the CD13<sup>+</sup> thymic DC population allowed to distinguish two main subpopulations of cDCs, defined as BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs and BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs (Figure 1a). Although variability exists among individuals, in most of the thymus samples analyzed the BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DC subpopulation tended to be less abundant ( $0.019 \pm 0.015\%$  of total thymic cells; range 0.0003–0.055%;  $n = 22$ ) than that of BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs ( $0.031 \pm 0.024\%$  of total thymic cells; range 0.0006–0.084%;  $n = 22$ ).

The phenotypic analysis showed that both cDC subsets exhibited distinct antigenic profiles. The C-type lectin CLEC9A has been demonstrated to be selectively expressed by BDCA3<sup>hi</sup> DCs from blood and peripheral lymphoid and non-lymphoid tissues<sup>9,11,14,17</sup> and, in concordance with these results, we found that the expression of CLEC9A was mainly confined to the thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DC subset (Figure 1b). Also in line with previous reports,<sup>9,14</sup> BDCA3<sup>hi</sup>

HLA-DR<sup>+</sup> DCs mostly lacked expression of CD11b, CD14 and CD1a and expressed low to intermediate levels of BDCA1 and CD11c (Figure 1b). In contrast, the subpopulation of BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs were mostly positive for CD11b, CD14 and CD1a and expressed high levels of BDCA1 and CD11c (Figure 1b). Both thymic DC subpopulations exhibited a similar expression of CD45RO, DEC205 and DC-SIGN and did not express CD7, CD45RA or high levels of CD123 (Figure 1b).

The expression of costimulatory molecules was also analyzed showing that BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs expressed lower levels of CD40, CD80, CD86, as well as CD83 than BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs (Figure 1c). Accordingly, the BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DC subpopulation exhibited a lower capacity to stimulate T cell proliferative responses (Figure 1d). These results, along with the fact that BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs expressed lower levels of HLA-DR, seemed to indicate that this DC subset includes less mature DCs. Bendriss-Vermare *et al.*<sup>3</sup> and Schmitt *et al.*<sup>4</sup> described in the human thymus populations of immature DCs, defined as HLA-DR<sup>int</sup> CD11c<sup>+</sup> DCs and CD11c<sup>+</sup>





**Figure 2** BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> DCs highly express IFN-λ and CXCL10 in response to TLR3 stimulation. (a) BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and (b) BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> DCs were isolated and mRNA levels for TLR1-9 were determined by quantitative RT-PCR. Results represent the mean (±s.d.) of four samples pooled from two independent experiments. GNB2L1 was used as endogenous control. (c–e) BDCA3<sup>hi</sup> DR<sup>+</sup> and BDCA3<sup>+</sup> DR<sup>hi</sup> DCs isolated from human thymus were stimulated with TLR1 (Pam3) or TLR3 (Poly I:C) agonists. After 12 h of culture, mRNA expression levels for IFN-λ1 (c), CXCL10 (d) and IFN-α1 (e) were determined by quantitative RT-PCR and compared with that observed *ex vivo* (0 h). (e) For comparison, pDC IFN-α1 expression before and after 12 h of culture with the indicated stimulus is represented. The mean (±s.d.) of duplicates in three independent experiments is shown. GNB2L1 was used as endogenous control. (f,g) Supernatants of stimulated DCs were assayed for protein levels of IFN-λ1 (f) and CXCL10 (g). Data from three independent experiments are shown.

CD14<sup>+</sup> DCs, respectively, and expressing low levels of costimulatory molecules and low allostimulatory capacity. It is likely that BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs could be included in those subpopulations. Also, it has been demonstrated that the subpopulation of immature CD11c<sup>+</sup> DCs

when stimulated with TSLP, a cytokine produced by the Hassall's corpuscles, upregulate HLA-DR, DC-LAMP and the costimulatory molecules CD80 and CD86, acquiring a phenotype similar to that described for mature thymic DCs.<sup>6,8</sup> In agreement with these results,

BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs constitute the thymic DC subset containing the highest proportion of TSLP receptor-positive cells (Figure 1b). However, the subset of CD11b<sup>+</sup> human thymic DCs was reported to comprise mature DCs.<sup>5</sup> This discrepancy with our results could be explained by the fact that the CD11b<sup>+</sup> DC subpopulation includes a highly variable proportion of DCs expressing high levels of BDCA3.

The chemokine receptor XCR1 has been described as a specific marker for BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> human peripheral DCsm, as well as homologous DC populations in other mammalian species.<sup>13,18</sup> When the expression of XCR1-encoding mRNAs was analyzed in sorted thymic DC populations, it was evident that BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs expressed high levels of XCR1 in comparison with the very low expression observed in BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs (Figure 1e). Similarly, IRF8 has been also demonstrated to be selectively expressed in BDCA3<sup>hi</sup> DC populations,<sup>11,14,19</sup> and we found that thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs showed a high expression of IRF8 and low or undetectable expression levels of IRF4<sup>14</sup> (Figure 1f).

The cross-presentation ability was tested using the cytosolic translocation assay described previously<sup>20,21</sup> and based on the fact that cross-presenting DCs transfer exogenous proteins into their cytosol. Thymic DCs were then incubated with horse cytochrome c, which can induce caspase-dependent apoptosis upon translocation to the cytosol, and as shown in Figure 1g the proportion of cells becoming apoptotic after incubation with cytochrome c was higher in the BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DC subset. Both thymic DC subpopulations captured soluble proteins similarly, as shown by the efficient internalization of Lucifer yellow (Figure 1h), which indicates that BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs deliver internalized cargo to their cytosol more efficiently than BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs.

The results shown above indicate that thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs exhibit remarkable similarities with BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> DCs present in human peripheral blood and lymphoid and non-lymphoid organs, and because the BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> DCs are considered as equivalents of mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs,<sup>11,14</sup> it is not unlikely to think that human thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs could be homologous to the CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC subset appearing in the murine thymus. These CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs are assumed to be a resident DC subpopulation which arise from thymic progenitors,<sup>22</sup> therefore, we next examined whether BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs could be generated from human intrathymic precursor cells. The culture of CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> thymic precursors in multicytokine-supported cultures allowed their differentiation into BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs, as previously described,<sup>23</sup> and also into BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs. This latter subpopulation expressed CLEC9A, lacked CD11b and showed a lower expression of CD1a and BDCA1, as their *in vivo* counterparts (Supplementary Figure S1).

### TLR3 stimulation of thymic BDCA3<sup>hi</sup> DCs highly upregulates IFN- $\lambda$ and CXCL10

To gain some insight into the function of thymic BDCA3<sup>hi</sup> DCs their TLR expression profile was also examined. In agreement with previous reports,<sup>10,11,14</sup> BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs exhibited a more restricted TLR gene expression pattern showing high levels of TLR3 and very low or undetectable levels of TLR2, 4, 5 and 7 (Figure 2a). Low levels of TLR8 and TLR9 were also detected (Figure 2a), being TLR9 expression controversial because blood BDCA3<sup>hi</sup> DCs appear to respond to CpG in spite of an apparent lack of TLR9 mRNA expression.<sup>10,11</sup> Unlike BDCA3<sup>hi</sup> DCs, TLR4 and TLR5 were the most highly expressed TLRs in the BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DC subset (Figure 2b).

Functionally, BDCA3<sup>hi</sup> CLEC9A<sup>+</sup> DCs are beginning to be considered key players in the induction of antiviral and antitumor

immunity. It has been shown that, upon TLR3 stimulation, BDCA3<sup>hi</sup> DCs, as well as mouse CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs, are the major producers of IFN- $\lambda$ ,<sup>16,24,25</sup> a cytokine that has antiviral and antitumoral activity and modulates adaptive immunity.<sup>26,27</sup> In addition, BDCA3<sup>hi</sup> DCs stimulated with Poly I:C produce high levels of the chemokine CXCL10,<sup>9–11</sup> which has an important role in the generation of antiviral immunity.<sup>28,29</sup> A prominent production of IFN- $\alpha$ , having an important role in immune reactions to viral infection,<sup>30</sup> has been also recently described for BDCA3<sup>hi</sup> DCs after dsRNA recognition.<sup>31</sup> We therefore analyzed the expression of IFN- $\lambda$ , CXCL10 and IFN- $\alpha$  in thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs after stimulation with the TLR3 ligand Poly I:C. Figure 2c shows that IFN- $\lambda$ 1 expression was highly induced in BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs stimulated with Poly I:C but not Pam3, the ligand for TLR1 which was also considerably expressed in this DC subset. In comparison, the expression of IFN- $\lambda$ 1 was minimally upregulated in TLR-activated BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs. Likewise, the highest expression of CXCL10 could be detected in the BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DC subset after TLR3 activation (Figure 2d). Minimal or undetectable levels of IFN- $\alpha$  were found in both thymic DC subpopulations stimulated via TLR3 or TLR1 (Figure 2e). These results were corroborated at the protein level (Figures 2f and g). It should be noted that a role for RLHs in this process could not be discarded as it has been reported that the ectopic expression of components of RIG-I signal transduction pathway induces the activation of IFN- $\lambda$ 1 promoter.<sup>32</sup>

These data showing a strong response of thymic BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs to Poly I:C, along with the expression of IFN- $\lambda$  and CXCL10, suggest that this DC subpopulation could have an important role in the antiviral defense also in the thymus. Although traditionally considered as an immune-privileged site, it is now clear that the thymus is a target of infection by microbes including viruses (such as HIV, influenza virus, human cytomegalovirus and so on) and also bacteria, fungi and parasites which directly or indirectly can reach the thymus.<sup>33</sup> BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs could then function in the steady-state thymus as immune sentinels while concomitantly could also develop functions related to T cell differentiation, as the induction of the generation of FOXP3<sup>+</sup> Treg cells.<sup>6,8,34</sup> After thymic infection, BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs would become activated and produce prominent amounts of IFN- $\lambda$  and CXCL10 to control viral replication and spread. The elevation of CXCL10 levels could further contribute to the recruitment of CXCR3<sup>+</sup> Ag-specific T cells into the thymus to initiate the adaptive phase of the immune response.<sup>35</sup> Similarly, thymic pDCs are able to induce Treg cell differentiation in steady-state situations<sup>6,36</sup> and produce high amounts of IFN- $\alpha$  after influenza virus stimulation<sup>3</sup> or HIV infection in order to suppress virus replication.<sup>7,37</sup> Future work will be focused on the possible cooperation between these thymic DC subsets with antiviral functions and their possible cross-talk with other components of the innate immunity, such as NK cells that co-localize with pDCs in the human thymus and express after activation notable levels of XCL1 (our unpublished data), which is able to attract XCR1<sup>+</sup> DCs.

## METHODS

### Isolation of human thymic DCs

Human thymus samples from patients aged 1 month to 4 years undergoing corrective cardiac surgery were obtained and used according to the guidelines of the Medical Ethics Commission of Madrid-Montepríncipe and 12 de Octubre hospitals. Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki principles. Thymuses were dissected free of surrounding connective tissue and then gently disrupted with a potter homogenizer until completely disaggregated. Thymocyte suspensions were enriched in non-T cells by using

the sheep red blood cell rosetting technique and the resulting cell suspensions were used for phenotypic analyzes and for isolation of Lin<sup>−</sup> BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> and Lin<sup>−</sup> BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DCs (purity ≥ 97%) using a FACSaria III cell sorter (BD Biosciences) from the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Universidad Complutense de Madrid). When indicated Lin<sup>−</sup> CD123<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> DCs were sorted from the non-T cell enriched suspensions.

### DC Culture

Isolated thymic DC subsets (10<sup>6</sup> cells per ml) were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum and stimulated for 12 h in the presence of Poly I:C (12.5 μg ml<sup>−1</sup>) and Pam3CSK4 (1 μg ml<sup>−1</sup>, both from Invivogen).

Freshly isolated DCs were used at different numbers as stimulators for resting allogeneic naive CD4<sup>+</sup> T cells (2 × 10<sup>5</sup>) isolated by magnetic sorting (Miltenyi Biotec) from buffy coats (Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid). Lymphocytes were labeled with 5 μM CFSE (Sigma-Aldrich) to determine their proliferative response by the CFSE dilution method after 6 days of culture.

For DC differentiation experiments, intrathymic CD1a<sup>−</sup> CD34<sup>+</sup> precursor cells were isolated as previously described<sup>38</sup> and cultured for 6–10 days with a cytokine cocktail containing rhIL-6 (5 ng ml<sup>−1</sup>), rhSCF (200 ng ml<sup>−1</sup>), rhIL-1β (280 pg ml<sup>−1</sup>), rhIL-7 (1000 IU ml<sup>−1</sup>), rhGM-CSF (75 ng ml<sup>−1</sup>) and rhFLT3 ligand (100 ng ml<sup>−1</sup>) from Life Technologies, Prospec and NIBSC.

### Flow cytometry

Phenotypic characterization of thymic DC subsets was performed by flow cytometry using the following fluorochrome-conjugated mAbs from BD Biosciences, BioLegend, Caltag, Immunostep and Miltenyi Biotec: CD1a (HI149), BDCA1/CD1c (L161), CD7 (CD7-6B7), CD11b (DCIS1/18), CD11c (Bly6), CD14 (M5E2), CD19 (HIB19), CD40 (5C3), CD45RA (HI100), CD45RO (UCHL1), CD80 (BB1), CD83 (HB15e), CD86 (IT2.2), CD123 (9F5), BDCA3/CD141 (M80), DEC205/CD205 (MG38), DC-SIGN/CD209 (9E9A8), TSLPR (1B4) and HLA-DR (L243 and GRB1). Biotin-conjugated anti-CLEC9A (kindly provided by Dr D Sancho, CNIC, Madrid) was followed by fluorochrome-conjugated Streptavidine (Jackson ImmunoResearch). Three- and four-color immunofluorescence stainings were performed and conducted in a FACSCalibur flow cytometer (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid).

### Cytosolic translocation assays

For the cytochrome c killing assay, non-T cell enriched thymocyte suspensions were cultured with different concentrations of horse heart cytochrome c (Sigma-Aldrich) or vehicle (H<sub>2</sub>O) for 24 h and, after extensive washing, apoptosis was measured in Lin<sup>−</sup> BDCA3<sup>hi</sup> HLA-DR<sup>+</sup> and Lin<sup>−</sup> BDCA3<sup>+</sup> HLA-DR<sup>hi</sup> DC subsets. Apoptotic cells were defined as PI<sup>−</sup>/Annexin<sup>+</sup> and the percentage of specific apoptosis (%SA) was calculated as follows:

$$\%SA = \frac{(\%Apoptotic\ Cyt\ C - treated\ cells) - (\%Apoptotic\ vehicle - treated\ cells)}{\%Apoptotic\ vehicle - treated\ cells} \times 100$$

To test the ability to internalize Lucifer yellow, thymocyte suspensions were cultured for 24 h in complete medium and then pulsed with Lucifer Yellow (1 mg ml<sup>−1</sup>) for 4 h at 37 °C or 4 °C. Cells were extensively washed and the percentage of Lucifer Yellow<sup>+</sup> cells was analyzed by flow cytometry in DC subsets.

### Real-time quantitative RT-PCR

RNA isolation and total cDNA synthesis were performed as previously described.<sup>38</sup> Real-time PCR reactions for CXCL10, IFN-α1, IFN-λ1, IRF4, IRF8 and TLR1-9 were performed in duplicates with pre-developed TaqMan assay reagents (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. GNB2L1 was used as endogenous control. Amplifications, detections and analyzes were performed in a 7900HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, Universidad Complutense de Madrid). The Delta CT method was used for normalization to GNB2L1 mRNA.

### Cytokine measurements

DC culture supernatants were collected after 36 h of stimulation and levels for IFN-λ1 and CXCL10 were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (eBioscience) and Cytometric Bead Array Flex Set system (BD Biosciences), respectively.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants SAF2012-33180 (Ministerio de Economía y Competitividad), S2010/BMD-2420 (Comunidad de Madrid) and RD12/0019/0007 (Instituto de Salud Carlos III). LH and AE are supported by pre-doctoral fellowships (AP2009-4324 and AP2010-0795, respectively) from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. We thank the Pediatric Cardiosurgery Units from Hospital Madrid-Montepíncipe and Hospital 12 de Octubre for thymus samples.

- 1 Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 2005; **17**: 304–312.
- 2 Hadeiba H, Butcher EC. Thymus-homing dendritic cells in central tolerance. *Eur J Immunol* 2013; **43**: 1425–1429.
- 3 Bendriss-Vermare N, Barthelemy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Mouliau N *et al*. Human thymus contains IFN-α-producing CD11c(−), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest* 2001; **107**: 835–844.
- 4 Schmitt N, Cumont MC, Nugeyre MT, Hurtrel B, Barre-Sinoussi F, Scott-Algara D *et al*. *Ex vivo* characterization of human thymic dendritic cell subsets. *Immunobiology* 2007; **212**: 167–177.
- 5 Vandenabeele S, Hochrein H, Mavaddat N, Winkel K, Shortman K. Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* 2001; **97**: 1733–1741.
- 6 Martin-Gayo E, Sierra-Filardi E, Corbi AL, Toribio ML. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* 2010; **115**: 5366–5375.
- 7 Gurney KB, Colantonio AD, Blom B, Spits H, Uittenbogaart CH. Endogenous IFN-α production by plasmacytoid dendritic cells exerts an antiviral effect on thymic HIV-1 infection. *J Immunol* 2004; **173**: 7269–7276.
- 8 Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W *et al*. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005; **436**: 1181–1185.
- 9 Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P *et al*. Human tissues contain CD141<sup>hi</sup> cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 2012; **37**: 60–73.
- 10 Hemont C, Neel A, Heslan M, Braudeau C, Josien R. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J Leukoc Biol* 2013; **93**: 599–609.
- 11 Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE *et al*. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 2010; **207**: 1247–1260.
- 12 Robbins SH, Walzer T, Dembele D, Thibault C, Defays A, Bessou G *et al*. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* 2008; **9**: R17.
- 13 Crozat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre CA, Ventre E *et al*. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8α<sup>hi</sup> dendritic cells. *J Exp Med* 2010; **207**: 1283–1292.
- 14 Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen JL *et al*. Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8α<sup>hi</sup> dendritic cells. *J Exp Med* 2010; **207**: 1261–1271.
- 15 van der Aa E, van Montfort N, Woltman AM. BDCA3+CLEC9A+ human dendritic cell function and development. *Semin Cell Dev Biol* (e-pub ahead of print; doi:10.1016/j.semcdb.2014.05.016).
- 16 Lauterbach H, Bathke B, Gilles S, Traidl-Hoffmann C, Lubert CA, Fejer G *et al*. Mouse CD8α<sup>hi</sup> DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-λ in response to poly I:C. *J Exp Med* 2010; **207**: 2703–2717.
- 17 Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadieu MH, Sastre-Garau X, Soumelis V, Amigorena S. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2012; **209**: 653–660.
- 18 Dutertre CA, Jourdain JP, Rancez M, Amraoui S, Fossum E, Bogen B *et al*. TLR3-responsive, XCR1+, CD141(BDCA-3)+/CD8α<sup>hi</sup>-equivalent dendritic cells uncovered in healthy and simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Immunol* 2014; **192**: 4697–4708.
- 19 Aliberti J, Schulz O, Pennington DJ, Tsujimura H, Reis e Sousa C, Ozato K *et al*. Essential role for ICSBP in the *in vivo* development of murine CD8α<sup>hi</sup> + dendritic cells. *Blood* 2003; **101**: 305–310.

- 20 Lin ML, Zhan Y, Proietto AI, Prato S, Wu L, Heath WR *et al*. Selective suicide of cross-presenting CD8<sup>+</sup> dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 3029–3034.
- 21 Segura E, Durand M, Amigorena S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells. *J Exp Med* 2013; **210**: 1035–1047.
- 22 Li J, Park J, Foss D, Goldschneider I. Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J Exp Med* 2009; **206**: 607–622.
- 23 de Yébenes VG, Carrasco YR, Ramiro AR, Toribio ML. Identification of a myeloid intrathymic pathway of dendritic cell development marked by expression of the granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor. *Blood* 2002; **99**: 2948–2956.
- 24 Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N *et al*. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013; **57**: 1705–1715.
- 25 Zhang S, Kodys K, Li K, Szabo G. Human type 2 myeloid dendritic cells produce interferon-lambda and amplify interferon-alpha in response to hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2013; **144**: 414–425 e7.
- 26 Lasfar A, Abushahba W, Balan M, Cohen-Solal KA. Interferon lambda: a new sword in cancer immunotherapy. *Clin Dev Immunol* 2011; **2011**: 349575.
- 27 Lopusna K, Rezuchova I, Betakova T, Skovranova L, Tomaskova J, Lukacikova L *et al*. Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. *Acta Virol* 2013; **57**: 171–179.
- 28 Larrubia JR, Benito-Martinez S, Calvino M, Sanz-de-Villalobos E, Parra-Cid T. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2008; **14**: 7149–7159.
- 29 Yuan J, Liu Z, Lim T, Zhang H, He J, Walker E *et al*. CXCL10 inhibits viral replication through recruitment of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Circ Res* 2009; **104**: 628–638.
- 30 Wang BX, Fish EN. The yin and yang of viruses and interferons. *Trends Immunol* 2012; **33**: 190–197.
- 31 Meixlspurger S, Leung CS, Ramer PC, Pack M, Vanoaica LD, Breton G *et al*. CD141<sup>+</sup> dendritic cells produce prominent amounts of IFN-alpha after dsRNA recognition and can be targeted via DEC-205 in humanized mice. *Blood* 2013; **121**: 5034–5044.
- 32 Osterlund PI, Pietila TE, Veckman V, Kotenko SV, Julkunen I. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol* 2007; **179**: 3434–3442.
- 33 Nunes-Alves C, Nobrega C, Behar SM, Correia-Neves M. Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection. *Trends Immunol* 2013; **34**: 502–510.
- 34 Lei Y, Ripen AM, Ishimaru N, Ohigashi I, Nagasawa T, Jeker LT *et al*. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med* 2011; **208**: 383–394.
- 35 Nobrega C, Nunes-Alves C, Cerqueira-Rodrigues B, Roque S, Barreira-Silva P, Behar SM *et al*. T cells home to the thymus and control infection. *J Immunol* 2013; **190**: 1646–1658.
- 36 Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E *et al*. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus. *J Immunol* 2010; **184**: 2999–3007.
- 37 Keir ME, Stoddart CA, Linquist-Stepps V, Moreno ME, McCune JM. IFN-alpha secretion by type 2 predendritic cells up-regulates MHC class I in the HIV-1-infected thymus. *J Immunol* 2002; **168**: 325–331.
- 38 Valencia J, Hernandez-Lopez C, Martinez VG, Hidalgo L, Zapata AG, Vicente A *et al*. Transient beta-catenin stabilization modifies lineage output from human thymic CD34<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> progenitors. *J Leukoc Biol* 2010; **87**: 405–414.

The Supplementary Information that accompanies this paper is available on the Immunology and Cell Biology website (<http://www.nature.com/icb>)

# Autocrine activation of canonical BMP signaling regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells

Víctor G. Martínez<sup>1</sup>, Laura Hidalgo<sup>1</sup>, Jaris Valencia<sup>1</sup>,  
Carmen Hernández-López<sup>1</sup>, Ana Entrena<sup>1</sup>, Beatriz G. del Amo<sup>1</sup>,  
Agustín G. Zapata<sup>2</sup>, Angeles Vicente<sup>1</sup>, Rosa Sacedón<sup>\*1</sup> and Alberto Varas<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are multifunctional growth factors regulating differentiation and proliferation in numerous systems including the immune system. Previously, we described that the BMP signaling pathway is functional in human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs), which were found to express both the specific receptors and the Smad proteins required for signal transduction. In this study, we provide evidence that human MoDCs produce BMP-4 and that this production is increased over the maturation process as is BMP signal transduction. When DCs are matured in the presence of an inhibitor of the BMP pathway, the expression of the maturation markers PD-L1 and PD-L2 is reduced, while cytokine production is not affected. As a result, these mature DCs present an augmented ability to stimulate both T cells and NK cells. Eventually, the inhibition of BMP signaling during maturation causes a reduced expression of IRF-1, a transcription factor that positively regulates the expression of PD-L1 and PD-L2. The present study indicates that the BMP signaling pathway regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human MoDCs during the maturation process, probably through the IRF-1 transcription factor, and also points out that the manipulation of BMP signaling might considerably improve the immunogenicity of MoDCs used in immunotherapy.

**Keywords:** Bone morphogenetic proteins · Dendritic cells · Dorsomorphin · PD-L1 · PD-L2



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

## Introduction

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are members of the TGF- $\beta$  superfamily [1]. The BMP signaling pathway is initiated when dimeric ligands associate with type I and type II BMP receptors, which are transmembrane serine/threonine kinases, forming a multimeric receptor-ligand complex. Within this complex,

type I BMP receptors are phosphorylated by ligand-bound type II BMP receptors and then phosphorylate and activate some components of the Smad protein family, Smad1, 5 and 8, called BMP receptor-regulated Smads (BR-Smads) [1, 2]. Subsequently, BR-Smads form complexes with the common partner Smad4 and translocate into the nucleus, where they regulate the transcription of BMP target genes, including Id proteins and Runx

**Correspondence:** Dr. Alberto Varas  
e-mail: avaras@bio.ucm.es

<sup>\*</sup>These authors contributed equally to this work.



## ORIGINAL ARTICLE

# The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation

Víctor G Martínez<sup>1</sup>, Carmen Hernández-López<sup>1</sup>, Jaris Valencia<sup>1</sup>, Laura Hidalgo<sup>1</sup>, Ana Entrena<sup>1</sup>, Agustín G Zapata<sup>2</sup>, Angeles Vicente<sup>1</sup>, Rosa Sacedón<sup>1,3</sup> and Alberto Varas<sup>1,3</sup>

Bone morphogenetic proteins (BMPs), members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily, are multifunctional polypeptides regulating a broad spectrum of functions in embryonic and adult tissues. Recent reports have demonstrated that BMPs regulate the survival, proliferation and differentiation of several cell types in the immune system. In this study, we investigate the effects of BMP signaling activation on the capacity of human dendritic cells (DCs) to stimulate immune responses. Human DCs express type I and type II BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB, type IA activin receptor, BMPRII) and BMP signal transduction molecules (Smad1, 5, and 8, as well as Smad4). On BMP stimulation, Id1–3 (inhibitor of differentiation 1–3/DNA binding) mRNA expression is upregulated and this effect can be blocked with the inhibitor dorsomorphin, showing that the canonical BMP signal transduction pathway is functionally active in DCs. BMP signaling activation promotes the phenotypic maturation of human DCs by increasing the expression of co-stimulatory molecules and also CD83, programmed cell death ligand 1 (PD-L1) and PD-L2, and stimulates cytokine secretion, mainly interleukin-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . Accordingly, BMP-treated DCs exhibit an enhanced T-cell stimulatory capacity. BMP signaling also enhances the survival of human DCs increasing the Bcl-2/Bax ratio. Finally, the expression of Runx transcription factors is increased in mature DCs, and the mRNA levels of Runx1–3 are upregulated in response to BMP stimulation, indicating that Runx transcription factor family may mediate the effects of BMP signaling in human DC maturation.

*Immunology and Cell Biology* (2011) 89, 610–618; doi:10.1038/icb.2010.135; published online 23 November 2010

**Keywords:** bone morphogenetic proteins; dendritic cells; dorsomorphin; Id proteins; Runx proteins

Bone morphogenetic proteins (BMPs) constitute a large subgroup of secreted signaling proteins that belong to the transforming growth factor (TGF)- $\beta$  superfamily.<sup>1</sup> BMPs are synthesized as large precursor molecules, which are proteolytically cleaved to release the mature proteins. The active forms usually consist of homodimers that can initiate signaling by binding to heteromeric complexes constituted by transmembrane receptors, termed type I and type II, exhibiting serine/threonine kinase activity. The type II BMP receptor (BMPRII) combined with one of the following type I receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRIB)/ALK-6 and type IA activin receptor (ActRIA)/ALK-2, are the most common components of BMP receptors. The constitutively active type II receptors phosphorylate type I receptors on ligand binding, and the activated type I receptors subsequently phosphorylate downstream targets of at least two signaling cascades.<sup>1–3</sup> The canonical BMP signaling pathway involves the Smad protein family. Specifically, the BMP receptor-regulated Smads (BR-Smads), Smad1, Smad5 and Smad8, are phosphorylated and activated by type I BMP receptors. Once phosphorylated, BR-Smads dissociate from the receptors, form complexes with Smad4, translocate into the nucleus, bind to BMP

responsive elements and function as transcriptional co-modulators to induce or repress BMP target gene expression.<sup>1,2</sup> The members of the Id (inhibitor of differentiation/DNA binding) protein family, a class of helix–loop–helix proteins, have been shown to be important targets for BMP signaling.<sup>1,4</sup> In addition to the canonical Smad-dependent signaling pathway, the activated receptor complexes may initiate a non-canonical Smad-independent pathway leading to activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK).<sup>1,3</sup>

BMPs were originally identified as growth and differentiation factors for osteogenic cells,<sup>5</sup> and are now considered as multifunctional polypeptides.<sup>6</sup> BMPs have key roles in the development of many organs and also function in adult tissues.<sup>1,3,7,8</sup> In the immune system, BMP6 inhibits the proliferation of human B cell progenitors as well as mature B cells through the Smad-dependent pathway.<sup>9,10</sup> Likewise, different members of BMP family have been demonstrated to have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in multiple myeloma cells.<sup>11,12</sup> We and others have shown that BMP2, BMP4 and BMP7 are the main ligands expressed in the human and murine thymus.<sup>13–15</sup> BMP4 enhances the survival of thymocyte precursors and inhibits their proliferation.<sup>15,16</sup> Also, BMP4 arrests early T-cell

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain and <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain  
<sup>3</sup>These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Dr A Varas, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid 28040, Spain.

E-mail: avaras@bio.ucm.es

Received 25 May 2010; revised 8 October 2010; accepted 14 October 2010; published online 23 November 2010

development.<sup>13–16</sup> In humans, these effects have been attributed to the ability of BMP4 to counteract the interleukin (IL)-7-induced proliferation and differentiation of thymic CD34<sup>+</sup> progenitors, indicating that BMP may function as a maintenance factor for intrathymic precursor cells.<sup>16</sup> Peripheral T cells also express BMP receptors and BMP stimulation activates the canonical and non-canonical BMP pathways.<sup>17,18</sup> BMP signaling regulates CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation, enhances the antigen-induced interferon- $\gamma$  production by effector/memory CD8<sup>+</sup> T cells and synergizes with TGF- $\beta$  to induce Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells.<sup>17–20</sup> Different BMPs stimulate chemotactic responses and induce TGF- $\beta$  expression in monocytes.<sup>21,22</sup> Likewise, the treatment of macrophages with BMP-6 inhibits their proliferation and stimulates the production of pro-inflammatory factors, such as

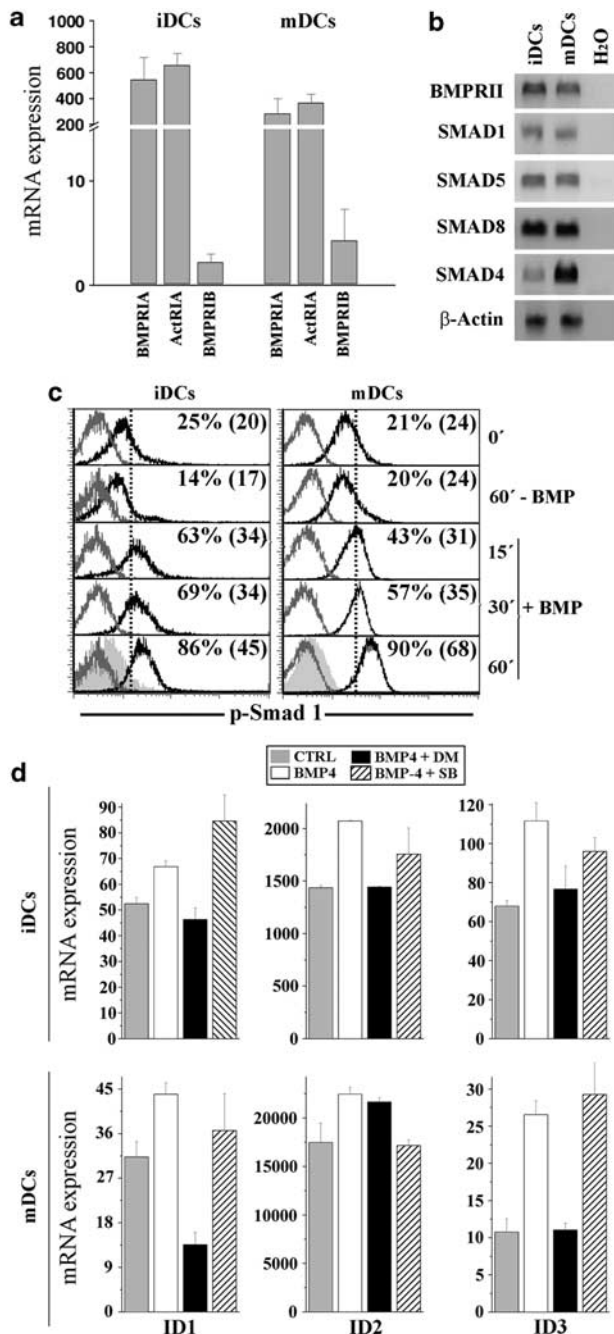
tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase.<sup>23,24</sup> The expression of BMP receptors has been also described in murine bone marrow dendritic cells (DCs),<sup>25</sup> and Pluchino *et al.*<sup>25</sup> reported that neural stem/precursor cells impair DC activation via soluble factors whose activity can be blocked by the presence of the BMP antagonist Noggin. In this study, we demonstrate that the canonical BMP signaling pathway is functionally active in human monocyte-derived DCs (MoDCs). BMP signaling increases the viability of MoDCs and also induces the expression of co-stimulatory molecules, increases cytokine production and enhances DC allostimulatory capacity. These effects seem to be mediated by Runx transcription factors and the Id protein family.

## RESULTS

### BMP signaling pathway is functionally active in human MoDCs

To determine the relevance of BMP signaling in human DCs, we first assessed by quantitative reverse transcriptase-PCR the expression of BMP receptors in MoDCs. The three type I BMP receptors were detected in immature and mature DCs, and BMPRIA and ActRIA were more prominently expressed than BMPRIB (Figure 1a). Both DC populations also expressed specific RNAs for the type II receptor BMPRII and for BR-Smads, Smad1, Smad5 and Smad8, as well as for the common Smad4 (Figure 1b). These data suggested that BMP signaling pathway is active in human MoDCs, and this was confirmed studying the effect of BMP addition on Smad1 phosphorylation. Smad1 is a BR-Smad, directly phosphorylated and functionally activated by the BMP receptor on BMP ligand binding.<sup>1,2</sup> As shown in Figure 1c, the levels of phosphorylated Smad1 increased gradually in both immature and mature DCs during the culture with BMP4 for 1 h. We also analyzed whether the BMP-stimulated phosphorylation of Smad1 could trigger transcriptional changes of target genes. In this regard, *Id* genes have been shown to be important downstream transcriptional targets of BMP signaling in multiple cell types.<sup>4,17,26,27</sup> Thus, we detected an increase of *Id1*, *Id2* and mainly *Id3* mRNA in immature and mature DCs after a short-time exposure to BMP4 (Figure 1d).

Additionally, we wanted to investigate whether the upregulation of *Id* expression levels in DCs occurred exclusively through the Smad-mediated canonical BMP signaling pathway. For this purpose, DCs were treated with dorsomorphin, an inhibitor of BMP type I receptor



**Figure 1** Human monocyte-derived dendritic cells express BMP signaling pathway components. (a) Quantitative reverse transcriptase-PCR analysis of type I BMP receptor expression in immature and mature DCs. Expression was normalized to that of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Bars represent mean  $\pm$  s.d. of at least three independent experiments. (b) Reverse transcriptase-PCR analysis of the expression of different components of the BMP signaling pathway on immature and mature DCs. H<sub>2</sub>O served as negative control. (c) The levels of phosphorylated Smad1 were determined by flow cytometry on immature and mature DCs cultured in the presence or absence of BMP4 for the indicated time points. The percentages of positive cells and mean fluorescence intensities are shown in the histograms. Gray histograms indicate background staining and filled histograms represent blocking peptide pre-absorbed antibody staining as negative control. Results are representative of two independent experiments. (d) Quantitative reverse transcriptase-PCR analysis of the BMP-induced upregulation of *Id1*, *Id2* and *Id3* mRNA levels. Immature and mature DCs were treated during 1 h with either BMP4 alone (white bars), the inhibitor dorsomorphin and BMP4 (black bars), or the inhibitor SB203580 and BMP4 (hatched bars). DCs were left untreated for the basal levels of *Id* mRNAs (gray bars). Results are representative of two independent experiments.

serine–threonine kinase activity that blocks BMP ligand-induced phosphorylation of BR-Smads.<sup>28,29</sup> The treatment with the inhibitor reduced the BMP-stimulated Id1/Id3 mRNA expression to basal levels in both immature and mature DCs (Figure 1d). Id2 upregulation was blocked by the treatment with dorsomorphin only in immature DCs (Figure 1d). In mature DCs, the stimulation of Id2 expression was inhibited by the treatment with SB203580, a specific p38 MAPK inhibitor, which minimally affected Id1/Id3 expression (Figure 1d). These results indicate that, in MoDCs, BMP signal transduction is mediated mainly through the canonical Smad pathway.

#### BMP4 enhances the survival of human DCs

The relevance of BMP signaling in MoDCs was first assessed by culturing immature and mature DCs in serum-free medium supplemented with BMP4, and evaluating cell viability by annexin V/propidium iodide staining. After 36 h, immature DCs treated with different doses of BMP4 (ranging from 0.1 to 100 ng ml<sup>-1</sup>) were always protected from spontaneous cell death compared with untreated immature DCs, and the survival effect of BMP4 was maximal for concentrations from 1 to 10 ng ml<sup>-1</sup> (Figure 2a). On the contrary, the addition of different doses of BMP4 to mature DC cultures had minimal effects on their viability, and only the highest dose induced a modest decrease in the proportion of apoptotic mature DCs (Figure 2a).

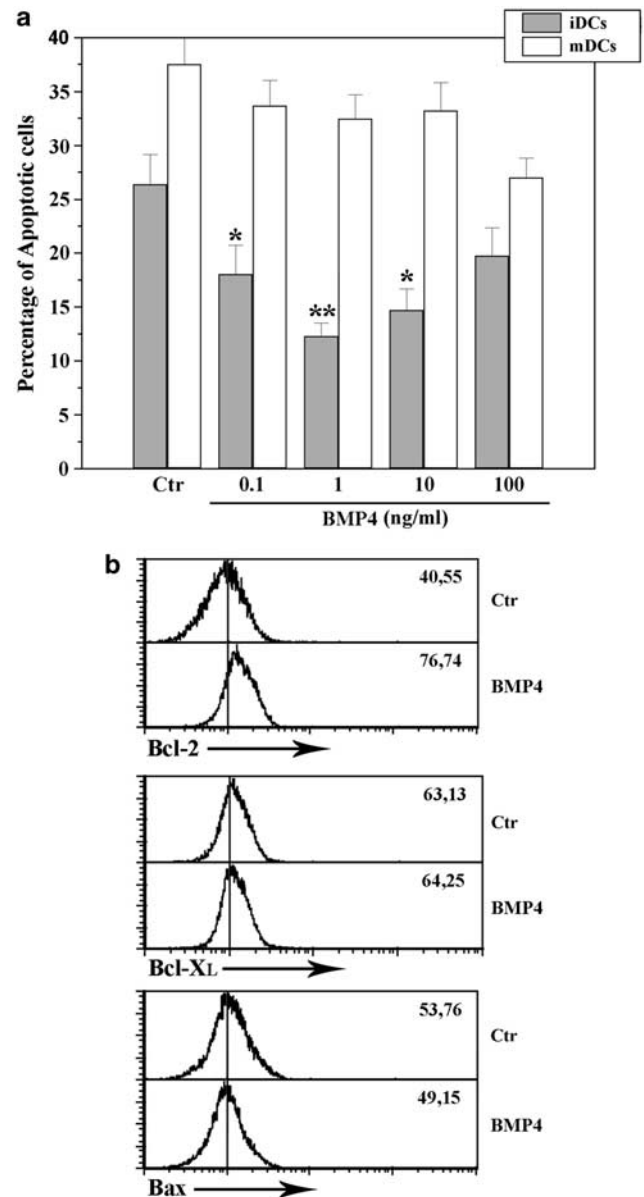
To elucidate possible molecular mechanisms by which BMP signaling inhibits apoptosis induced by growth factor deprivation in immature DCs, we examined in untreated and BMP4-treated DC suspensions the expression of different Bcl-2 family proteins, known to control DC survival.<sup>30–32</sup> Figure 2b shows that the presence of BMP4 induced a twofold upregulation of Bcl-2 protein expression, whereas the expression of Bax protein hardly changed. Therefore, the stimulation of BMP signaling induced a notable increase in the Bcl-2/Bax ratio (untreated DCs: 0.7; BMP-treated DCs: 1.5), which correlated with the higher survival of immature DCs in BMP4-treated cultures. In contrast, the expression of another anti-apoptotic component of the Bcl-2 family, Bcl-X<sub>L</sub>, was not affected by the addition of BMP4 (Figure 2b).

#### BMP signaling stimulation promotes phenotypic maturation of human DCs

We next evaluated whether BMP4 had an effect on the phenotype of immature DCs. In the presence of BMP4, immature DCs were gradually upregulating the expression of the co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 over a 60 h period (Figures 3a and b). Both the expression levels and the proportion of CD83-expressing DCs also increased after BMP4 addition (Figures 3a and b). Likewise, the expression of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) and PD-L2, which has been described to be upregulated in MoDCs and peripheral blood DCs on maturation,<sup>33,34</sup> was also notably induced in the presence of BMP4 (Figures 3a and b).

The effects induced by BMP4 on the phenotype of immature DCs were very similar to those induced by CD40L, and also by other maturation stimuli, such as lipopolysaccharide (LPS) and TNF- $\alpha$  (Figure 3c). Additionally, the specificity of the effects seen after BMP4 addition was demonstrated by the fact that the presence of the inhibitor of the canonical BMP signaling pathway, dorsomorphin, selectively abrogated the effects induced by BMP4 (Figure 3c).

In mature DCs, the stimulation of BMP signaling induced slight increments only in the expression of the co-stimulatory molecules (data not shown).

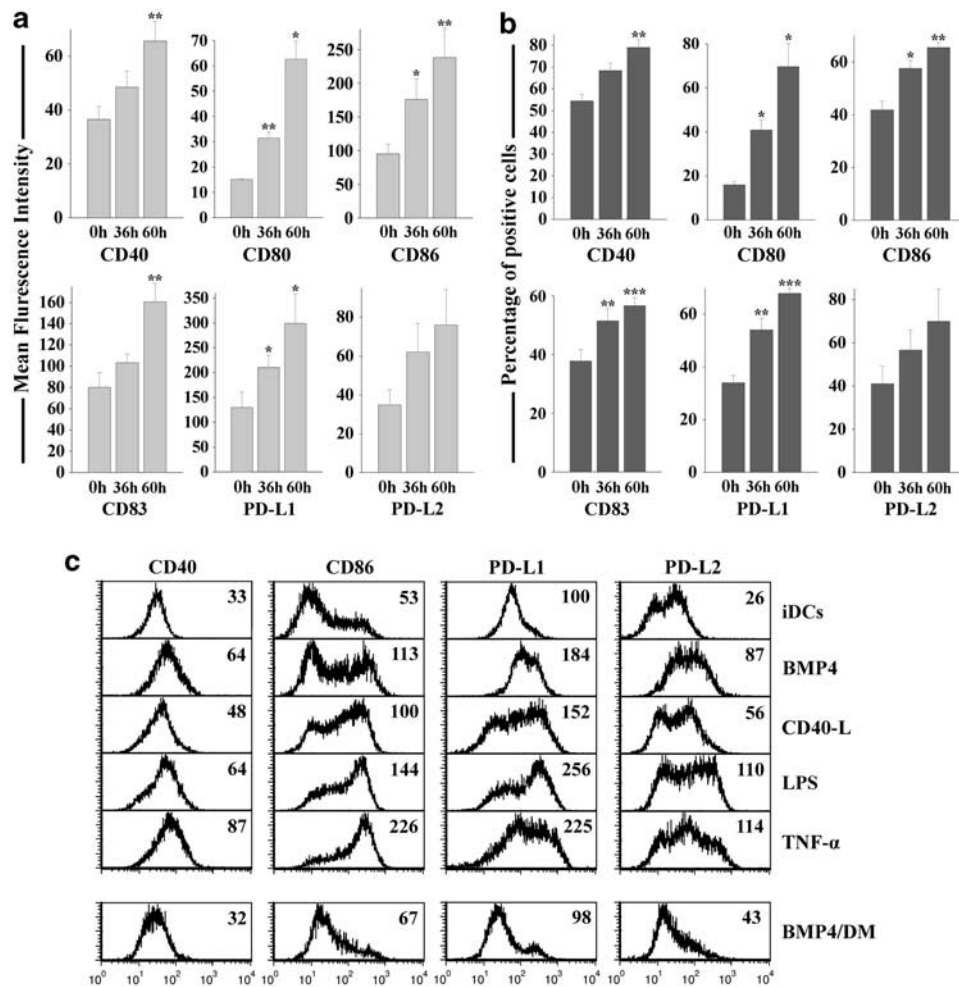


**Figure 2** BMP4 increases the viability of human monocyte-derived dendritic cells. (a) Determination of immature and mature DC (gray and white bars, respectively) viability after 36 h of culture in serum-free medium alone or supplemented with different doses of BMP4. The percentages of apoptotic cells were determined by staining with annexin V and propidium iodide. Apoptotic cells were defined as annexin V-positive/propidium iodide negative. Results represent the mean  $\pm$  s.d. of three to four independent experiments (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ ; by *t*-test). (b) The expression of Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> and Bax proteins was determined by flow cytometry in untreated and BMP4-treated immature DCs. Solid lines represent background staining. The percentages of positive cells are indicated in each histogram. Ctr, control.

#### BMP signaling enhances human DC allostimulatory capacity

To analyze the capacity of BMP signaling to affect DC functionality, BMP4-treated immature DCs were co-cultured with allogeneic CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. The mixed lymphocyte reaction assays revealed that BMP-treated DCs were able to stimulate T-cell proliferative responses more efficiently than untreated immature DCs, as also did LPS-matured DCs (Figure 4). As shown in Figure 4, when  $5 \times 10^5$  DCs





**Figure 3** Flow cytometry analysis of DC maturation after exposure to BMP4. The expression of CD40, CD80, CD86, CD83, PD-L1 and PD-L2 was analyzed in monocyte-derived DCs before and after treatment with BMP4 for 36 and 60 h. The mean fluorescence intensity (a) and the percentage of positive cells (b) for the different maturation markers are shown. Results represent the mean  $\pm$  s.d. of four to six independent experiments (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ ; by *t*-test). (c) The expression of CD40, CD86, PD-L1 and PD-L2 was analyzed in immature DCs treated for 60 h with CD40 ligand, LPS, TNF- $\alpha$ , BMP4 and BMP4 plus the inhibitor dorsomorphin in comparison with untreated DCs. The mean fluorescence intensities are indicated in each histogram. Treatment with dorsomorphin and BMP4 did not significantly affect cell viability.

were used as stimulatory cells, the proliferative response induced by BMP-treated DCs was twice than that stimulated by immature DCs.

No differences were detected in the T-cell stimulatory capacity of untreated and BMP-treated mature DCs (data not shown).

#### BMP stimulates cytokine production by human DCs

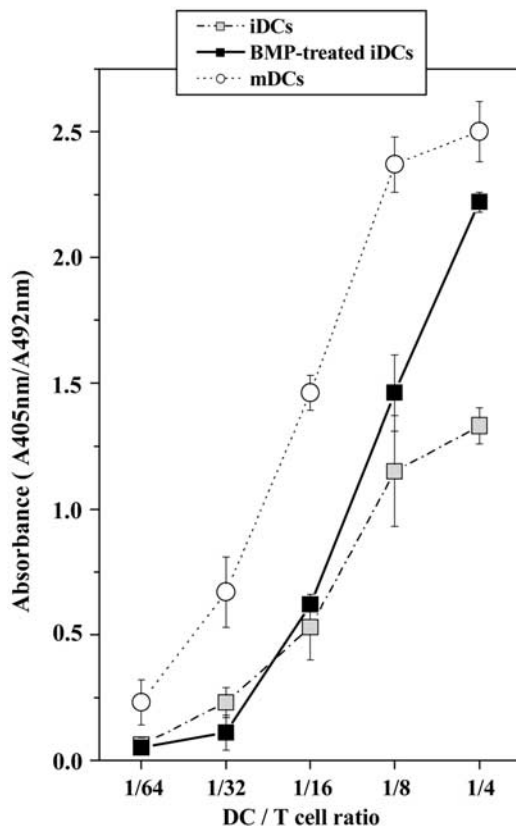
The maturation of DCs is a process associated with the secretion of a wide spectrum of cytokines. To study the effects of BMP signaling stimulation on DC cytokine production, immature DCs were cultured with or without BMP4 and, after 36 h, supernatants were analyzed for the presence of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- $\alpha$ . The presence of BMP4 significantly increased the secretion of IL-8 by immature DCs (Figure 5a). Also, BMP signaling promoted DC production of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 (Figure 5a). The levels of IL-1 $\beta$  detected in culture supernatants were not affected by BMP4 (Figure 5a), and BMP stimulation did not modulate the secretion of IL-12, which was produced by immature DCs at very low or undetectable levels with or without BMP4 (data not shown).

We also measured the concentrations of different cytokines produced in mixed lymphocyte reaction assays established with untreated

and BMP-treated DCs. The levels of interferon- $\gamma$  notably increased when BMP-treated DCs were used as stimulators (Figure 5b), in agreement with their enhanced ability to stimulate T-cell proliferation. No remarkable changes were detected in the levels of IL-4, IL-10 and IL-12 (Figure 5b).

#### BMP induces the expression of Runx family genes in human DCs

Runx transcription factors are common targets of the BMP signaling pathway and, in several distinct biological systems, Runx and BR-Smad proteins physically interact with each other on activation of BMP signaling and cooperatively regulate the transcription of target genes.<sup>2,35,36</sup> On the other hand, it has been proposed that Runx3 contributes to the acquisition of the phenotypic and functional capabilities of mature DCs.<sup>37</sup> Thus, we next investigate whether the components of the Runx protein family could be mediating the effects of BMP in human DCs. Immature DCs were cultured for 1 h in the presence or absence of BMP4, and the expression of Runx transcription factors was analyzed by quantitative reverse transcriptase-PCR. As shown in Figure 6a, the mRNA levels of the three components of Runx family were upregulated on activation of BMP signaling in



**Figure 4** BMP-treated DCs exhibit an increased T-cell stimulatory capacity. Immature DCs were left untreated (iDCs) or were treated with BMP4 or LPS (mDCs) for 36 h and used at different numbers as stimulators for resting allogeneic T cells. After 5 days of co-culture, cells were pulsed for 12 h with BrdU. A specific kit was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Results represent the mean  $\pm$  s.d. of triplicates of one representative experiment.

human DCs. In accordance with these results, the comparative analysis of Runx expression in immature and mature DCs showed that the expression of Runx1, and mainly Runx2 and Runx3, was highly induced during maturation of human MoDCs (Figure 6b).

## DISCUSSION

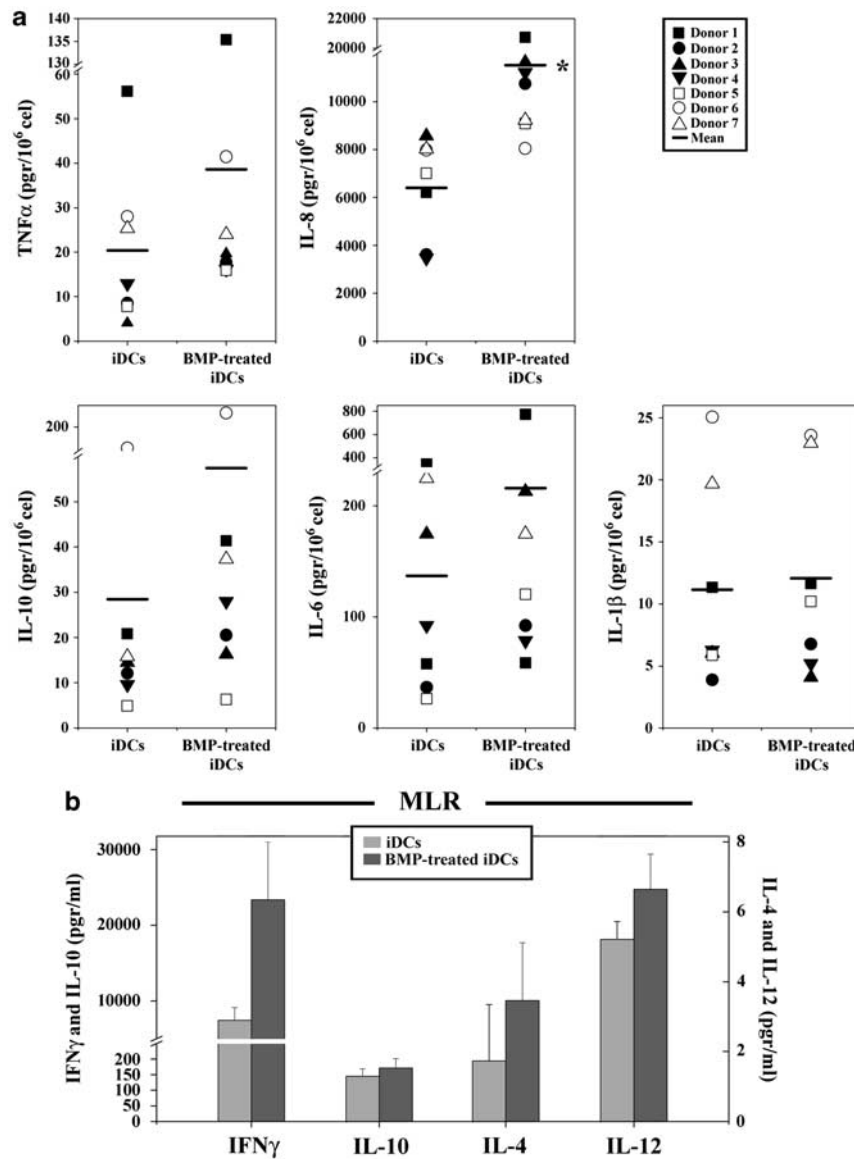
Members of the BMP family have important roles in the regulation of cell proliferation and differentiation in the hematopoietic and immune systems. Several studies have reported effects of BMPs in hematopoietic stem cells,<sup>38</sup> B lymphocytes,<sup>9–11</sup> granulocytes,<sup>39</sup> erythrocytes<sup>40</sup> as well as thymocytes<sup>13–16</sup> and peripheral T cells.<sup>17,18</sup> However, less is known regarding possible effects of BMPs in DCs. In this study, we demonstrate the presence of a functional BMP signaling pathway in human DCs. Both immature and mature MoDCs express the three type I BMP receptors, BMPRIA, BMPRIB and ActRIA, and the type II receptor BMPRII. Similarly, Pluchino *et al*<sup>25</sup> described the expression of BMP receptors in murine bone marrow-derived DCs before and after stimulation with LPS. In addition, we show that immature and mature DCs also express the BR-Smads, Smad1, Smad5 and Smad8, and the common mediator Smad4. All these plasma membrane and intracellular components are found to be efficient in signal transduction induced by BMP4, given the ability of both DC populations to phosphorylate Smad1 and modulate the expression of Id proteins, mainly Id3, in response to BMP stimulation.

Id genes are primary targets of BMP signaling in different cells, and their expression is upregulated by the canonical Smad-mediated BMP signaling pathway but also by the non-canonical p38 MAPK-mediated BMP pathway.<sup>17,26,27</sup> The treatment of MoDCs with specific inhibitors for the canonical and non-canonical pathways reflects differences in the BMP signaling pathway during DC maturation. In immature DCs, BMP signaling increases Id expression exclusively through the canonical Smad pathway. In contrast, the inhibition of the canonical BMP signaling in mature DCs suppresses the upregulation of Id1 and Id3 but not Id2 expression, which appears to be controlled by the p38 MAPK dependent BMP pathway. The activation of these distinct signaling cascades seems to be greatly dependent on the presence or absence of preformed type I/type II receptor complexes on the cell surface. Thus, binding of BMP to a preformed receptor complex triggers clathrin-dependent internalization and initiates the Smad pathway, whereas BMP-induced recruitment of receptors results in internalization via caveolae and activation of different, Smad-independent pathways, for example, p38 MAPK signaling.<sup>3</sup> Both the canonical and the non-canonical BMP pathways have been repeatedly described to be involved in the positive and negative regulation of cell proliferation, survival and differentiation, and such regulation have been found to be highly cell type specific.<sup>16,17,26,27,41</sup>

According to our findings, the canonical BMP signaling pathway seems to be mainly involved in the control of the survival and maturation of human MoDCs. In immature but not mature DCs the activation of BMP signaling inhibits growth factor depletion-induced apoptosis. Similarly, BMPs have been described to enhance the viability of different cell types, including intrathymic progenitor cells,<sup>15,16</sup> mesenchymal stem cells,<sup>42</sup> endothelial cells,<sup>43</sup> cardiomyocytes,<sup>44</sup> neurons,<sup>45</sup> and cancer cells.<sup>46</sup> These survival-promoting effects of BMPs are mediated by the upregulation of the anti-apoptotic Bcl-2<sup>47</sup> or Bcl-X<sub>L</sub> proteins.<sup>48</sup> In agreement with these previous studies, BMP treatment increases the Bcl-2/Bax ratio in DCs, mainly due to the induction of the expression of Bcl-2 protein.

An interesting finding of our study is that the activation of BMP signaling promotes the phenotypic maturation of human DCs, as BMP upregulates the expression of the co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86, as well as other cell markers for mature DCs, such as CD83, PD-L1 and PD-L2. These effects are similar to those induced by well-known DC maturation stimuli, such as CD40 L, LPS and TNF- $\alpha$ , and can be abrogated by the presence of the inhibitor of the canonical BMP signaling pathway, such as dorsomorphin. In addition, BMP treatment stimulates the secretion of IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and, mainly, IL-8 by DCs and concomitantly, BMP-treated DCs exhibit an enhanced allostimulatory activity. All these results indicate that the canonical BMP signaling pathway is involved in the acquisition of a mature phenotype by human MoDCs, and we hypothesize that this signaling pathway could be triggered by DC maturation stimuli. Supporting this idea, the stimulation of Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 with peptidoglycan and LPS, respectively, induces BMP expression and activates BMP signaling pathway in aortic valve interstitial cells.<sup>49</sup> Likewise, several authors have reported that TNF- $\alpha$  stimulates the BMP pathway in different cell types.<sup>50,51</sup> Additionally, other components of the pro-inflammatory cytokine cocktail used to generate mature DCs, such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and prostaglandin E2, have been also shown to stimulate BMP production.<sup>52–54</sup>

The three mammalian Runx transcription factors are master regulators of certain differentiative processes and control important steps during the developmental acquisition of mature phenotypes. Runx proteins mediate the responses of cells to several signaling

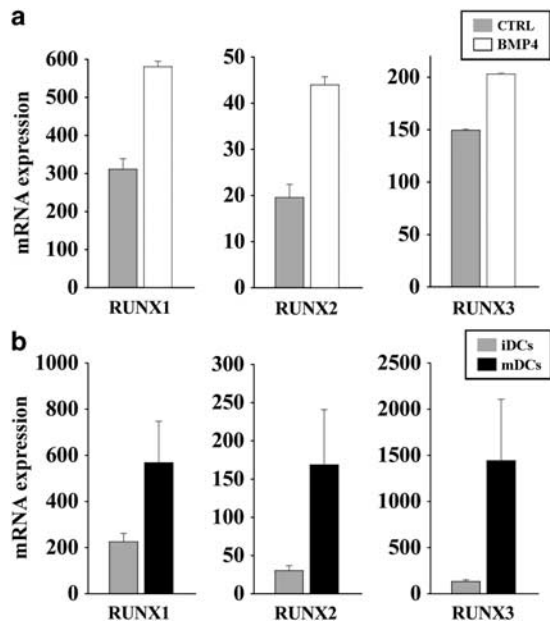


**Figure 5** Cytokine secretion in the presence of BMP4. (a) Immature DCs were cultured in the presence or absence of BMP4, and the supernatants were collected after 36 h. The levels of IL-8 and TNF- $\alpha$  were determined by ELISA, and the levels of IL-6, IL-10 and IL-1 $\beta$  were measured by a cytometric bead array system. Data from seven independent experiments are shown. (b) Untreated and BMP-treated immature DCs were cultured with allogeneic T cells for 6 days, and the culture supernatants were used to determine the levels of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-12p70 by ELISA. Results represent the mean  $\pm$  s.d. of three independent experiments. \* $P \leq 0.05$ ; by  $t$ -test. MLR, mixed lymphocyte reaction.

pathways, including BMP, TGF- $\beta$  and other growth factor signals.<sup>35,36,55</sup> In human DCs, the expression of the three components of Runx family is upregulated on activation of BMP signaling, which correlates with the fact that the expression of Runx1, and mainly Runx2 and Runx3, is higher in mature versus immature DCs. Thus, these results indicate that Runx proteins could be mediating the effects of BMP in the survival and maturation of human DCs. The induction of Runx3 expression in immature DCs exposed to maturation signals has been previously reported in both murine and human DCs,<sup>37,56</sup> and Fainaru *et al*<sup>37</sup> showed that the lack of Runx3 in murine bone marrow-derived DCs leads to an altered DC maturation. Also in support, it has been described that Runx proteins directly interact with Smads, and target them to subnuclear sites of active transcription.<sup>36,57</sup> BMP/Smad target genes include *Id* genes<sup>4,17,26,27</sup> and our results show

that *Id1-3* gene expression is upregulated after short-term BMP-4 treatment, indicating that the *Id* protein family may also mediate BMP effects on human DCs. Transcriptional profiling studies have revealed an important role for *Id2* during DC differentiation and maturation.<sup>58</sup>

The TGF- $\beta$  superfamily includes BMPs and also TGF- $\beta$ s and activins, which signal through specific type I receptors and components of the Smad family, different to BR-Smads.<sup>1</sup> During DC maturation activin signaling is upregulated in response to inflammatory and immune stimuli, Toll-like receptor agonists and whole bacteria,<sup>59,60</sup> and seems to function attenuating the capacity of DCs to produce cytokines and chemokines, as well as their T-cell stimulatory function.<sup>59–61</sup> On the contrary, TGF- $\beta$  signaling pathway is downregulated during DC maturation,<sup>59,62</sup> which agrees with previous results showing that activation of TGF- $\beta$  signaling mediates the



**Figure 6** Runx expression is induced on BMP treatment. (a) Quantitative reverse transcriptase-PCR analysis of the BMP-induced upregulation of Runx1, Runx2 and Runx3 mRNA levels. Immature DCs were cultured for 1 h in the absence (gray bars) or presence (white bars) of BMP4. Expression was normalized to that of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Results are representative of three independent experiments. (b) Quantitative reverse transcriptase-PCR analysis of Runx expression in immature and mature DCs. Bars represent mean  $\pm$  s.d. of six independent experiments. CTRL, control.

suppression of DC functions, as TGF- $\beta$  prevents DC maturation *in vitro*, reduces their antigen-presentation capacity and inhibits cytokine secretion, and upregulation of co-stimulatory molecules.<sup>62–64</sup> However, TGF- $\beta$  does not affect activin signaling.<sup>60</sup> Then, further work is needed to dissect the complex cross-talk between TGF- $\beta$ /activin and BMP signaling pathways underlying to DC maturation process.

In conclusion, we provide the first evidence for the involvement of the canonical BMP signaling pathway in the maturation, and also survival, of human MoDCs. These findings also point out that the manipulation of BMP signaling might have a considerable impact on therapeutic applications involving human MoDCs through modulating DC viability and functionality.

## METHODS

### Human DC culture

Peripheral blood mononuclear cells from buffy coats of healthy donors (Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, Spain) were obtained by density gradient centrifugation with lymphocyte isolation solution (Rafar, Madrid, Spain). Monocytes were isolated from mononuclear cells by positive magnetic separation using CD14 immunomagnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch, Germany). CD14<sup>+</sup> cells ( $10^6$  ml<sup>-1</sup>) were cultured for 6 days in AIM-V serum-free medium (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 1 mM L-glutamine and 20 ng ml<sup>-1</sup> granulocyte-macrophage colony stimulating factor plus 20 ng ml<sup>-1</sup> IL-4 (Invitrogen) to generate immature DCs. Half of the culture medium was replaced by fresh medium and granulocyte-macrophage colony stimulating factor/IL-4 on days 2 and 4 of culture. On day 6, immature DCs were matured for 36 or 60 h by adding to the culture a pro-inflammatory cytokine cocktail –IL-1 $\beta$  (10 ng ml<sup>-1</sup>; Invitrogen), IL-6 (15 ng ml<sup>-1</sup>; Invitrogen), TNF- $\alpha$  (10 ng ml<sup>-1</sup>) and prostaglandin E2 (1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; Sigma España,

Spain). When indicated, the maturation stimulus was either LPS (100 ng ml<sup>-1</sup>; Sigma España), TNF- $\alpha$  (10 ng ml<sup>-1</sup>; Invitrogen), or CD40 L (1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; Prospecc-Tany TechnoGene Ltd, USA). In some experiments, DCs were treated with rhBMP4 (100 ng ml<sup>-1</sup>; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) alone or with the inhibitor of the canonical BMP signaling pathway dorsomorphin (2  $\mu$ M; Calbiochem, Nottingham, UK) or the p38 MAPK inhibitor SB203580 (10  $\mu$ M; Calbiochem). In the BMP signaling inhibition assays, cells were pre-treated with dorsomorphin or SB203580 alone for 1 h.

### PCR analysis

RNA isolation was performed using Absolutely RNA Microprep kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA), including a DNase I digestion step, as recommended by the supplier, to avoid genomic DNA contamination. Total complementary DNA (cDNA) was synthesized by High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the supplier's instructions, and then used as target in the PCR amplifications. Standard PCR was carried out as previously described.<sup>13</sup> Real-time PCR was performed with the following Taq-man assays: BMPRIA (Hs01034909\_g1), BMPRIIB (Hs00176144\_m1), ActRIA (Hs00153836\_m1), Id1a (Hs00357821\_g1), Id1b (Hs00704053\_s1), Id2 (Hs00747379\_m1), Id3 (Hs00171409\_m1), Runx1 (Hs01021971\_m1), Runx2 (Hs01047976\_m1), Runx3 (Hs00231709\_m1), all of them obtained from Applied Biosystems. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Pre-Developed TaqMan) was used as endogenous control. All PCR reactions were set in duplicates using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Amplifications, detections, and analyses were performed in a 7900HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, Complutense University, Madrid, Spain). The  $\Delta$ Ct method was used for normalization to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mRNA.

### Flow cytometry

The following monoclonal antibody (mAb) conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), phycoerythrin-Cy5 or allophycocyanin were used for flow cytometric analysis: CD40 (5C3), CD80 (BB1), CD83 (HB15e), CD86 (IT2.2), PD-L1/CD274 (29E.2A3) and PD-L2/CD273 (24F.10C12) from BD Biosciences (San José, CA, USA) and BioLegend (San Diego, CA, USA). Two-, three- and four-color immunofluorescence stainings were performed by incubating the cells in phosphate-buffered saline containing 1% of fetal calf serum and 0.1% of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min at 4 °C. For the intracellular stainings, and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4 °C, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with PE-conjugated anti-human Bcl-2 mAb (BD Biosciences), anti-human Bcl-X<sub>L</sub> mAb (Chemicon, Temecula, CA, USA), anti-human Bax Ab (BD Biosciences), followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-mouse or anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA), all diluted in Perm/Wash buffer. To detect phosphorylated Smad-1, cells were fixed with BD cellFIX (BD Biosciences) for 30 min at 4 °C to enable a phosphorylation-state analysis. Then, cells were washed with phosphate-buffered saline, permeabilized by 30 min incubation on ice with BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences) and stained with anti-human phospho-Smad1 (Ser<sup>463</sup>/Ser<sup>465</sup>; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories), all diluted in phosphate-buffered saline. As a negative control, cells were incubated with antibodies pre-absorbed with the blocking peptide (Santa Cruz Biotechnology), following manufacturer's instructions. Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University of Madrid.

### Apoptosis assays

Immature and mature DCs were cultured in AIM-V alone or supplemented with different doses of rhBMP4. After 36 h, the proportion of apoptotic cells was determined by staining with Annexin-V-FITC (BD Biosciences), according to the supplier's instructions. Cells were analyzed on a FACSCalibur flow



cytometer (Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University) and gated according to forward scatter, side scatter, and their ability to exclude propidium iodide. Apoptotic cells were defined as annexin-V-positive cells in the propidium iodide-negative population.

### Mixed lymphocyte reaction assays

Immature and mature DCs were used at different numbers as stimulators for resting allogeneic T cells ( $2 \times 10^5$ ) isolated from peripheral blood. The cultures were performed in 96-well flat-bottom culture plates, using RPMI 1640 supplemented with 10% of fetal calf serum (Invitrogen). After 5 days, the cultures were pulsed for 12 h with  $10 \mu\text{M}$  5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). A specific kit from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain), BrdU Labeling and Detection Kit III, was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA, as previously described.<sup>32</sup> Briefly, the labeling medium was removed, and cells were dried (2 h at  $60^\circ\text{C}$ ), fixed in ethanol in HCl (0.5 M) for 30 min at  $-20^\circ\text{C}$ , treated with nucleases (30 min at  $37^\circ\text{C}$ ), and then incubated with peroxidase-conjugated Fab fragments of mouse anti-BrdU (30 min at  $37^\circ\text{C}$ ). The peroxidase reaction was developed with ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)-diammonium salt) substrate, and the sample absorbance was measured using an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) reader (ELX800MB, Bio-Tek Instruments, VT, USA) at 405 nm with a reference wavelength at 492 nm.

### Cytokine measurements

Culture supernatants of immature DCs were harvested after 36 h of culture in the presence or absence of BMP4. The concentrations of IL-8 and TNF- $\alpha$  were determined by ELISA (BioLegend). The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and IL-12 were measured using the human Cytometric Bead Array Flex Set system (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions, using a FACS-Calibur flow cytometer (Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University). Culture supernatants from mixed lymphocyte reaction assays were collected after 6 days of culture and the concentrations of interferon- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-12 were determined by ELISA (BioLegend).

### Statistical analysis

The Student *t*-test was used for statistical analysis. Values of  $P \leq 0.05$  (\*),  $P \leq 0.01$  (\*\*) and  $P \leq 0.001$  (\*\*\*) were considered to be statistically significant.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants BFU2006-00651, BFU2007-65520 and BFU2009-10315 from the Ministerio de Ciencia e Innovación, RD06/0010/0003 from the Instituto de Salud Carlos III, GR58/08-910552 from the Universidad Complutense y Comunidad Autónoma de Madrid and PR34/07-15867 from the Universidad Complutense and Grupo Santander. We thank to the Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid for the buffy coat samples.

- 1 Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 2010; **147**: 35–51.
- 2 Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; **16**: 251–263.
- 3 Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; **20**: 343–355.
- 4 Miyazono K, Miyazawa K. Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE* 2002; **2002**: PE40.
- 5 Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; **150**: 893–899.
- 6 Reddi AH. BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; **16**: 249–250.
- 7 Chen D, Zhao M, Harris SE, Mi Z. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci* 2004; **9**: 349–358.
- 8 Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; **10**: 1580–1594.
- 9 Kersten C, Dosen G, Myklebust JH, Sivertsen EA, Hystad ME, Smeland EB *et al*. BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis—upregulation of Id1 and Id3. *Exp Hematol* 2006; **34**: 72–81.

- 10 Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol* 2005; **6**: 9.
- 11 Hjertner O, Hjorth-Hansen H, Borset M, Seidel C, Waage A, Sundan A. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood* 2001; **97**: 516–522.
- 12 Ro TB, Holt RU, Brenne AT, Hjorth-Hansen H, Waage A, Hjertner O *et al*. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene* 2004; **23**: 3024–3032.
- 13 Cejalvo T, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, Diez B, Gutierrez-Frias C, Valencia J *et al*. Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. *Immunology* 2007; **121**: 94–104.
- 14 Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merkenschlager M. The developmentally regulated expression of twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* 2002; **196**: 163–171.
- 15 Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A *et al*. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* 2002; **169**: 5496–5504.
- 16 Varas A, Sacedon R, Hidalgo L, Martinez VG, Valencia J, Cejalvo T *et al*. Interplay between BMP4 and IL-7 in human intrathymic precursor cells. *Cell Cycle* 2009; **8**: 4119–4126.
- 17 Sivertsen EA, Huse K, Hystad ME, Kersten C, Smeland EB, Myklebust JH. Inhibitory effects and target genes of bone morphogenetic protein 6 in Jurkat TAg cells. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 2937–2948.
- 18 Varas A, Martinez VG, Hernandez-Lopez C, Hidalgo L, Entrena A, Valencia J *et al*. Role of BMP signalling in peripheral CD4+ T cell proliferation. *Immunologia* 2009; **28**: 125–130.
- 19 Lu L, Ma J, Wang X, Wang J, Zhang F, Yu J *et al*. Synergistic effect of TGF-beta superfamily members on the induction of Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol* 2010; **40**: 142–152.
- 20 Takai S, Tokuda H, Matsushima-Nishiwaki R, Saio M, Takami T, Kozawa O. TGF-beta superfamily enhances the antigen-induced IFN-gamma production by effector/memory CD8+ T cells. *Int J Mol Med* 2010; **25**: 105–111.
- 21 Cunningham NB, Paralkar V, Reddi AH. Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 11740–11744.
- 22 Perron JC, Dodd J. ActRIIA and BMPRII type II BMP receptor subunits selectively required for Smad4-independent BMP7-evoked chemotaxis. *PLoS One* 2009; **4**: e8198.
- 23 Hong JH, Lee GT, Lee JH, Kwon SJ, Park SH, Kim SJ *et al*. Effect of bone morphogenetic protein-6 on macrophages. *Immunology* 2009; **128**: e442–e450.
- 24 Kwon SJ, Lee GT, Lee JH, Kim WJ, Kim IY. Bone morphogenetic protein-6 induces the expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Immunology* 2009; **128**: e758–e765.
- 25 Pluchino S, Zanotti L, Brambilla E, Rovere-Querini P, Capobianco A, Alfaro-Cervello C *et al*. Immune regulatory neural stem/precursor cells protect from central nervous system autoimmunity by restraining dendritic cell function. *PLoS One* 2009; **4**: e95959.
- 26 Billings PC, Fiori JL, Bentwood JL, O'Connell MP, Jiao X, Nussbaum B *et al*. Dysregulated BMP signaling and enhanced osteogenic differentiation of connective tissue progenitor cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J Bone Miner Res* 2008; **23**: 305–313.
- 27 Ying QL, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 2003; **115**: 281–292.
- 28 Hong CC, Yu PB. Applications of small molecule BMP inhibitors in physiology and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; **20**: 409–418.
- 29 Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA *et al*. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol* 2008; **4**: 33–41.
- 30 Hon H, Rucker III EB, Hennighausen L, Jacob J. bcl-xL is critical for dendritic cell survival *in vivo*. *J Immunol* 2004; **173**: 4425–4432.
- 31 Nopora A, Brocker T. Bcl-2 controls dendritic cell longevity *in vivo*. *J Immunol* 2002; **169**: 3006–3014.
- 32 Hernandez-Lopez C, Valencia J, Hidalgo L, Martinez VG, Zapata AG, Sacedon R *et al*. CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio. *Immunol Lett* 2008; **120**: 72–78.
- 33 Breton G, Yassine-Diab B, Cohn L, Boulassel MR, Routy JP, Sekaly RP *et al*. siRNA knockdown of PD-L1 and PD-L2 in monocyte-derived dendritic cells only modestly improves proliferative responses to Gag by CD8(+) T cells from HIV-1-infected individuals. *J Clin Immunol* 2009; **29**: 637–645.
- 34 Karakhanova S, Meisel S, Ring S, Mahnke K, Enk AH. ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets. *Eur J Immunol* 2010; **40**: 254–266.
- 35 Cohen Jr MM. Perspectives on RUNX genes: an update. *Am J Med Genet A* 2009; **149A**: 2629–2646.
- 36 Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev* 2003; **13**: 43–47.
- 37 Fainaru O, Woolf E, Lotem J, Yarmus M, Brenner O, Goldenberg D *et al*. Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. *EMBO J* 2004; **23**: 969–979.
- 38 Detmer K, Walker AN. Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. *Cytokine* 2002; **17**: 36–42.

- 39 Wilke A, Traub F, Kienappel H, Griss P. Cell differentiation under the influence of rh-BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **284**: 1093–1097.
- 40 Fuchs O, Simakova O, Klenner P, Cmejlova J, Zivny J, Zavadil J *et al*. Inhibition of Smad5 in human hematopoietic progenitors blocks erythroid differentiation induced by BMP4. *Blood Cells Mol Dis* 2002; **28**: 221–233.
- 41 Morikawa Y, Zehir A, Maska E, Deng C, Schneider MD, Mishina Y *et al*. BMP signaling regulates sympathetic nervous system development through Smad4-dependent and -independent pathways. *Development* 2009; **136**: 3575–3584.
- 42 Solmesky LJ, Abekasis M, Bulvik S, Weil M. Bone morphogenetic protein signaling is involved in human mesenchymal stem cell survival in serum-free medium. *Stem Cells Dev* 2009; **18**: 1283–1292.
- 43 Teichert-Kuliszewska K, Kutryk MJ, Kuliszewski MA, Karoubi G, Courtman DW, Zucco L *et al*. Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circ Res* 2006; **98**: 209–217.
- 44 Izumi M, Fujio Y, Kunisada K, Negoro S, Tone E, Funamoto M *et al*. Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway. *J Biol Chem* 2001; **276**: 31133–31141.
- 45 Yabe T, Samuels I, Schwartz JP. Bone morphogenetic proteins BMP-6 and BMP-7 have differential effects on survival and neurite outgrowth of cerebellar granule cell neurons. *J Neurosci Res* 2002; **68**: 161–168.
- 46 Yang S, Pham LK, Liao CP, Frenkel B, Reddi AH, Roy-Burman P. A novel bone morphogenetic protein signaling in heterotypic cell interactions in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; **68**: 198–205.
- 47 Barneda-Zahonero B, Minano-Molina A, Badiola N, Fado R, Xifro X, Saura CA *et al*. Bone morphogenetic protein-6 promotes cerebellar granule neurons survival by activation of the MEK/ERK/CREB pathway. *Mol Biol Cell* 2009; **20**: 5051–5063.
- 48 Sugimori K, Matsui K, Motomura H, Tokoro T, Wang J, Higa S *et al*. BMP-2 prevents apoptosis of the N1511 chondrocytic cell line through PI3K/Akt-mediated NF-kappaB activation. *J Bone Miner Metab* 2005; **23**: 411–419.
- 49 Yang X, Fullerton DA, Su X, Ao L, Cleveland Jr JC, Meng X. Pro-osteogenic phenotype of human aortic valve interstitial cells is associated with higher levels of Toll-like receptors 2 and 4 and enhanced expression of bone morphogenetic protein 2. *J Am Coll Cardiol* 2009; **53**: 491–500.
- 50 Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Hikita A, Tanaka S, Yamane S *et al*. Pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha induces bone morphogenetic protein-2 in chondrocytes via mRNA stabilization and transcriptional up-regulation. *J Biol Chem* 2006; **281**: 27229–27241.
- 51 Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, Brenner RE, Wirth T. TNFalpha promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF-kappaB signaling pathway. *Bone* 2009; **45**: 367–376.
- 52 Arikawa T, Omura K, Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2004; **200**: 400–406.
- 53 Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* 2003; **85-A**(Suppl 3): 59–66.
- 54 Hagen M, Fagan K, Steudel W, Carr M, Lane K, Rodman DM *et al*. Interaction of interleukin-6 and the BMP pathway in pulmonary smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; **292**: L1473–L1479.
- 55 Nimmo R, Woollard A. Worming out the biology of Runx. *Dev Biol* 2008; **313**: 492–500.
- 56 Puig-Kroger A, Dominguez-Soto A, Martinez-Munoz L, Serrano-Gomez D, Lopez-Bravo M, Sierra-Filardi E *et al*. RUNX3 negatively regulates CD36 expression in myeloid cell lines. *J Immunol* 2006; **177**: 2107–2114.
- 57 Zaidi SK, Sullivan AJ, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Integration of Runx and Smad regulatory signals at transcriptionally active subnuclear sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 8048–8053.
- 58 Hacker C, Kirsch RD, Ju XS, Hieronymus T, Gust TC, Kuhl C *et al*. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol* 2003; **4**: 380–386.
- 59 Robson NC, Phillips DJ, McAlpine T, Shin A, Svobodova S, Toy T *et al*. Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood* 2008; **111**: 2733–2743.
- 60 Scutera S, Riboldi E, Daniele R, Elia AR, Fraone T, Castagnoli C *et al*. Production and function of activin A in human dendritic cells. *Eur Cytokine Netw* 2008; **19**: 60–68.
- 61 Segerer SE, Muller N, Brandt J, Kapp M, Dietl J, Reichardt HM *et al*. The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; **6**: 17.
- 62 Dumitriu IE, Dunbar DR, Howie SE, Sethi T, Gregory CD. Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2009; **182**: 2795–2807.
- 63 Geissmann F, Revy P, Regnault A, Lepelletier Y, Dy M, Brousse N *et al*. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol* 1999; **162**: 4567–4575.
- 64 Mou HB, Lin MF, Cen H, Yu J, Meng XJ. TGF-beta1 treated murine dendritic cells are maturation resistant and down-regulate Toll-like receptor 4 expression. *J Zhejiang Univ Sci* 2004; **5**: 1239–1244.



## Role of BMP signalling in peripheral CD4<sup>+</sup> T cell proliferation

Alberto Varas, Víctor G. Martínez, Carmen Hernández-López, Laura Hidalgo, Ana Entrena, Jaris Valencia, Agustín Zapata, Rosa Sacedón, Angeles Vicente

*Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid.*

### **PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN BMP EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4<sup>+</sup> PERIFÉRICAS**

*Recibido: 6 Septiembre 2009*

*Aceptado: 18 Septiembre 2009*

#### RESUMEN

Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs) desempeñan un papel clave durante la embriogénesis y organogénesis de vertebrados, y también se ha descrito que llevan a cabo diversas funciones en tejidos adultos con capacidad auto-renovadora. Varios trabajos han demostrado que distintas BMPs están implicadas en el control de la proliferación de diferentes tipos celulares hematopoyéticos. En este estudio nosotros evidenciamos que las células T CD4<sup>+</sup> periféricas de ratón expresan los tres tipos de receptores tipo I de BMP (BMPRIA, BMPRIB, ActRIA), y que la proporción de células T que expresan los receptores para BMPs incrementa notablemente tras estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD3 más anti-CD28. La vía de señalización BMP es funcional en estas células T CD4<sup>+</sup> periféricas puesto que al cultivarlas en presencia de BMP4 se incrementan los niveles de Smad1 fosforilada. Además, nuestros resultados demuestran que la adición de BMP2 y BMP4 durante la estimulación con anti-CD3/CD28 modula de manera diferencial la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup>. En conjunto, los resultados indican que la vía de señalización BMP juega un papel en las respuestas de células T.

**PALABRAS CLAVE:** Proteínas morfogenéticas óseas / Linfocitos T / Proliferación celular.

#### ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMPs) play a key role during vertebrate embryogenesis and organogenesis, and have also been described to function in self-renewing tissues in adults. Several reports have demonstrated that distinct BMPs are involved in the control of the proliferation of different hematopoietic cell types. In this study, we provide evidence that murine peripheral CD4<sup>+</sup> T cells express the three type I BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB, ActRIA), and the proportions of BMP-expressing T cells increases notably after both anti-CD3 and anti-CD3/CD28 stimulation. The BMP signalling pathway is functional in peripheral CD4<sup>+</sup> T lymphocytes since the culture of CD4<sup>+</sup> T cells in the presence of BMP4 increases the levels of phosphorylated Smad1. In addition, our results show that the addition of BMP2 and BMP4 during anti-CD3/CD28 stimulation differentially modulates the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells. Altogether, the data indicate a role for the signalling pathway of BMP in T cell responses.

**KEY WORDS:** Bone Morphogenetic Proteins / T cells / Cell Proliferation.



## INTRODUCTION

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are secreted signalling proteins, which form a subgroup of the TGF- $\beta$  superfamily<sup>(1)</sup>. BMPs initiate signalling by binding to a heteromeric complex constituted by type I and type II serine/threonine kinase receptors. Type II receptors are constitutively active kinases, which transphosphorylate type I receptors upon ligand binding. Type I receptors activate intracellular substrates by phosphorylation, and thus determine the specificity of intracellular signals. The main BMP receptors are constituted by the combination of type II BMP receptor (BMPRII) and the following type I receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRII)/ALK-6, and type IA Activin receptor (ActRIA)/ALK-2<sup>(2-6)</sup>. BMP signal transduction to the nucleus is mediated by proteins of the Smad family.

Specifically, Smad1, Smad5 and Smad8 (also called BMP receptor-regulated Smads or BR-Smads) are phosphorylated and activated by type I BMP receptors. BR-Smads then form complexes with Smad-4, which translocate into the nucleus where they regulate gene expression<sup>(5-7)</sup>. In addition to this canonical Smad-dependent signalling pathway, BMP receptors may activate a non-canonical Smad-independent pathway leading to phosphorylation of p38<sup>(8)</sup>.

BMPs were originally identified by their ability to induce ectopic cartilage and bone formation<sup>(9)</sup>. Nevertheless, it has been shown that BMPs also regulate cell proliferation, differentiation and apoptosis during embryogenesis<sup>(10)</sup>, and also in adult self-renewing tissues, such as the hematopoietic and immune systems. Different BMPs have been demonstrated to participate in the control of the expansion and differentiation of hematopoietic precursor cells, in synergy with several cytokines<sup>(11-13)</sup>. BMP6 inhibits the growth of human B cell progenitors and mature B lymphocytes<sup>(14,15)</sup>, and several BMPs have been shown to have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in multiple myeloma cells<sup>(16,17)</sup>. We and others have demonstrated the expression of BMP2 and BMP4 in the thymus, where these BMP ligands are involved in regulating proliferation, survival and differentiation during early T-cell development<sup>(18-20)</sup>.

The expression of BMP receptors has been reported in lymphoblastoid cell lines as well as in the Jurkat TAG cell line, whose proliferation is inhibited in the presence of BMP6<sup>(21,22)</sup>. We describe in this study the expression of functional BMP receptors in peripheral murine CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and the modulation of T cell proliferation by BMP2 and BMP4.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

Young adult BALB/c mice (4-6 weeks old) were purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) and maintained under pathogen-free conditions. Experiments were performed according to institutional guidelines and were approved by the Complutense University Ethical Committee for Animal Experimentation.

### Flow cytometry

The following mAb conjugated with FITC, PE, CyChrome or APC were used for flow cytometric analysis: CD4 (RM4-5), CD25 (PC61), and CD69 (H1.2F3) from BD Biosciences (San José, CA). The extracellular domains of BMP receptors were detected with PE-conjugated anti-BMPRIA (E-16) and anti-BMPRII (N-17) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), FITC-conjugated anti-BMPRIA antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN), and unconjugated anti-ActRIA antibodies (R&D Systems), followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA). Two- and three-color immunofluorescence stainings were performed by incubating the cells in PBS containing 1% FCS and 0.1% NaN<sub>3</sub> in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min at 4°C. For the intracellular stainings of phosphorylated Smad1, and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cytotfix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with anti-phospho-Smad1 (Ser463/Ser465) (Santa Cruz Biotechnology) followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories), all diluted in Perm/Wash buffer. Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University of Madrid).

### Proliferation assays

Naive CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from lymph nodes by magnetic sorting using a negative selection protocol (Miltenyi Biotech, Bergisch, Germany). Isolated CD4<sup>+</sup> T cells ( $1-2 \times 10^5$ ) were cultured in 96-well flat-bottom culture plates in AIM-V serum-free medium (Invitrogen, Grand Island, NY) and stimulated with immobilized anti-CD3 (3  $\mu$ g/ml) with or without anti-CD28 (1  $\mu$ g/ml) mAb (BD Biosciences). In some cultures different doses (1-300 ng/ml) of rhBMP4 (R&D Systems) and rhBMP2 (RDI Research Diagnostics, Flanders, NJ) were added. At different time points, cultures

were pulsed for 12 h with 10  $\mu$ M 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). A specific kit from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain), BrdU Labeling and Detection Kit III, was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Briefly, the labeling medium was removed, and cells were dried (2 h at 60 °C), fixed in ethanol in HCl (0.5 M) for 30 min at -20°C, treated with nucleases (30 min at 37°C), and then incubated with peroxidase-conjugated Fab fragments of mouse anti-BrdU (30 min at 37°C). The peroxidase reaction was developed with ABTS substrate, and the sample absorbance was measured using an ELISA reader (ELX800MB, Bio-Teck Instruments, VT) at 405 nm with a reference wavelength at 492 nm.

## RESULTS

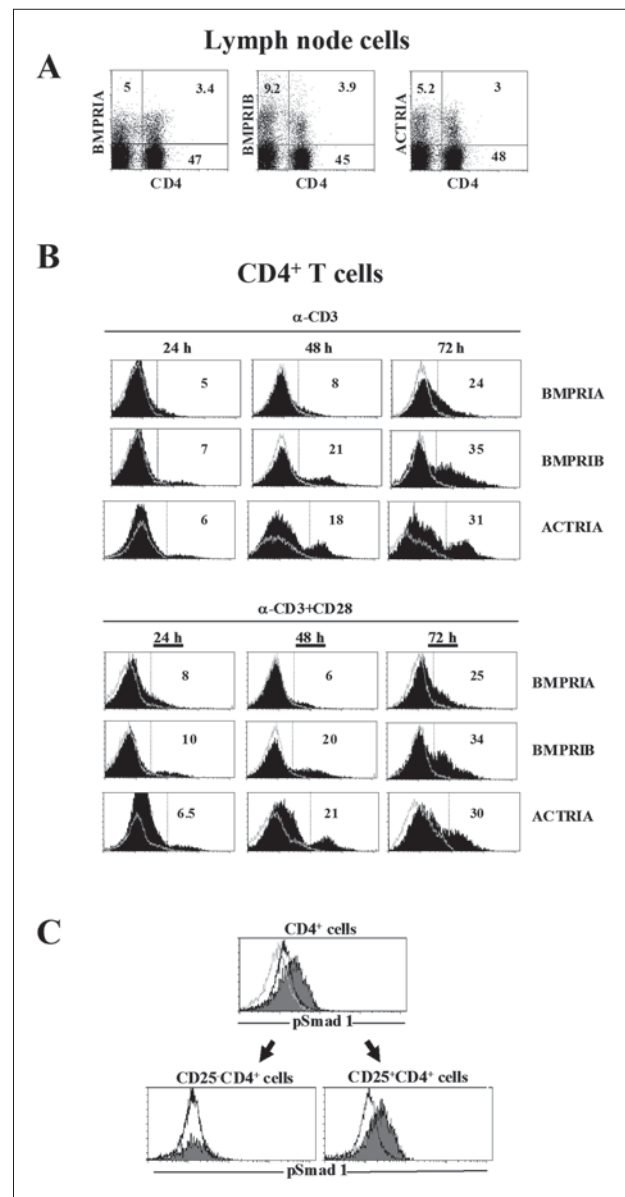
### Expression of a functional BMP signalling pathway in peripheral CD4<sup>+</sup> T cells

To determine whether murine CD4<sup>+</sup> T cells are targets for BMP, the cell surface expression of BMP receptors was analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 1A, about 6-8% of naive resting CD4<sup>+</sup> T cells expressed the three type I BMP receptors, BMPRIA, BMPRIB and ActRIA. Next, naive CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from lymph nodes, stimulated with immobilized anti-CD3 mAb with or without anti-CD28 mAb, and the BMP receptor expression was analyzed at different time points. Figure 1B shows that both anti-CD3 and anti-CD3/CD28 stimulations induced a similar up-regulation of BMP receptor expression. Activated CD4<sup>+</sup> T cells up-regulated BMPRIA expression at 72 h, whereas BMPRIB and ActRIA expression was clearly up-regulated at 48h, increasing the proportion of positive cells at 72 h (Figure 1B). After 48 h of stimulation, BMP receptor-bearing T cells mostly express CD69, and about 60% express CD25 (data not shown).

To demonstrate that the BMP signalling pathway is active in CD4<sup>+</sup> T cells, we studied the effect of BMP addition on Smad1 phosphorylation. Smad1 is a receptor regulated Smad, directly phosphorylated and functionally activated by the BMP receptor upon ligand binding<sup>(23)</sup>. The levels of phosphorylated Smad1 notably increased when CD4<sup>+</sup> T cells were cultured in the presence of BMP4 after stimulation with anti-CD3/CD28 mAb for 48 h (Figure 1C). In addition, we showed that the expression of phosphorylated Smad1 was associated with activated CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells (Figure 1C).

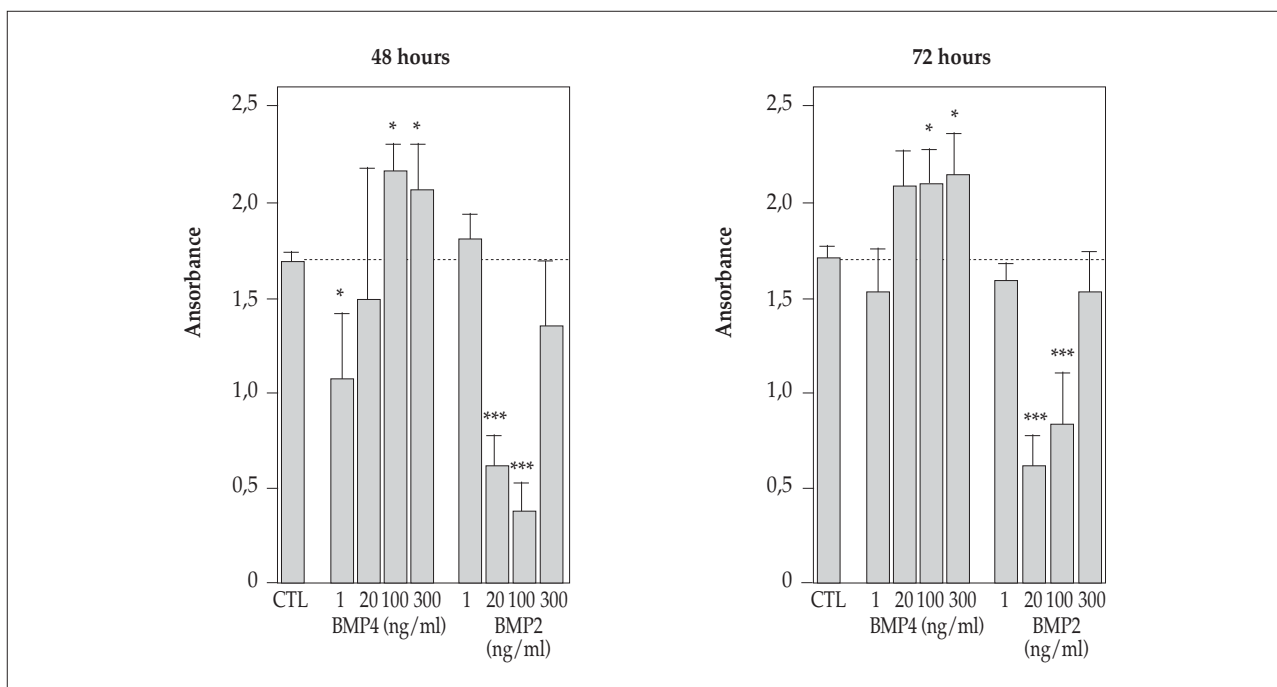
### BMP influences CD4<sup>+</sup> T cell proliferation

Given that the BMP signalling pathway is functionally active in peripheral CD4<sup>+</sup> T cells and has been also involved



**Figure 1.** Peripheral CD4<sup>+</sup> T cells express functional BMP receptors. A) Dot plots show the expression of CD4 vs type I BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB and ActRIA) on murine lymph node cells. B) CD4<sup>+</sup> T cells were isolated from lymph nodes, and stimulated with anti-CD3 or anti-CD3 plus CD28 mAb for 24, 48 and 72 h. Black histograms show the expression of BMPRIA, BMPRIB and ActRIA on activated T cells. Grey lines indicate background staining. The percentages of positive cells are shown in each histogram. C) Isolated CD4<sup>+</sup> T cells were stimulated with CD3/CD28 mAb for 48 h and after cultured in the absence (black lines) or presence (solid histograms) of BMP4 (100 ng/ml) for two more hours. The expression of CD4, CD25 and phosphorylated Smad1 was then analyzed. Grey lines indicate background staining.

in regulating the proliferation of several cell types<sup>(11,12,14-17,22)</sup>, we investigated whether BMP signalling modulates CD4<sup>+</sup> T cell proliferation. Naive peripheral CD4<sup>+</sup> T cells were



**Figure 2.** BMP2 and BMP4 influences CD4<sup>+</sup> T cell proliferation. Isolated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were stimulated with anti-CD3/CD28 in the absence or presence of different doses (1-300 ng/ml) of BMP2 and BMP4. After 48 and 72 h, T cell proliferation was analyzed by measuring BrdU incorporation into newly synthesized DNA, as described in Materials and Methods. Bars represent the mean ( $\pm$  SD) of three to four independent experiments (\*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ , by *t* test).

isolated and stimulated with anti-CD3/CD28 mAb for 48 and 72 h in the presence of different doses of BMP4 and BMP2, which we have previously shown that play an important role in T-cell differentiation in the murine thymus<sup>(20)</sup>. Interestingly, the effects of the addition of BMP4 and BMP2 on CD4<sup>+</sup> T cell proliferation were different. Low doses of BMP4 decreased the proliferative rate of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, whereas the addition of medium to high doses of BMP4 significantly stimulated the proliferation over control values (Figure 2). On the contrary, the presence of medium BMP2 doses drastically inhibited the proliferative response of CD4<sup>+</sup> T cells, whereas the addition of low and high doses of BMP2 hardly affected T-cell proliferation (Figure 2).

## DISCUSSION

In this study we report the expression of a functionally active BMP signalling pathway in murine peripheral CD4<sup>+</sup> T cells. Low numbers of naive CD4<sup>+</sup> T cells express BMP receptors but the proportions of BMP receptor-expressing T cells increase notably after anti-CD3 and anti-CD3/CD28 stimulation. The increase in the levels of phosphorylated Smad1 after short-term culture with BMP4 demonstrates that the BMP pathway is functional in peripheral CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. In agreement with our results, de la Peña et

al.<sup>(21)</sup> reported the expression of functional BMP receptors in lymphoblastoid cell lines established from human peripheral blood mononuclear cells. Likewise, Sivertsen et al.<sup>(22)</sup> showed that human Jurkat TAG cells as well as human peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells, mostly with a CD45RO<sup>+</sup> memory phenotype, express BMP receptors, and BMP6 stimulation of these cells led to Smad1/5/8 phosphorylation. However, the composition of the active BMP receptor complex expressed by T cells remains controversial. Our data indicate that the three type I BMP receptors are expressed similarly in both naive and activated CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, whereas BMPRIA is the main type I BMP receptor expressed by lymphoblastoid cell lines<sup>(21)</sup> and ActRIA is largely expressed in Jurkat TAG cells and human peripheral blood CD4<sup>+</sup> T cells<sup>(22)</sup>. A differential BMP receptor expression in distinct T cell subpopulations and species-specific differences could account for the discrepancy between these results.

Our results indicate that the BMP signalling pathway plays a role in peripheral T lymphocytes mainly after activation via CD3/TCR, influencing, at least, T cell proliferation. Different reports have demonstrated that BMP ligands have the ability to modulate the proliferation of several hematopoietic cell types such as thymocytes<sup>(18-20)</sup>, B lymphocytes<sup>(14, 15)</sup>, hematopoietic stem cells<sup>(11-13)</sup> and Jurkat TAG cells<sup>(22)</sup>.

An interesting finding derived from this study is that BMP2 and BMP4 ligands differentially modulate T cell proliferation. BMP2 and BMP4 normally induce similar cellular responses<sup>(24, 25)</sup>, but differential effects of different doses of BMP4 compared with BMP2 have been also reported on human hematopoietic stem cells<sup>(11)</sup>. Bathia and collaborators explained those results according to the possible existence of different cell subpopulations expressing different BMP receptors and/or regulatory intracellular molecules<sup>(11)</sup>. Since both canonical (Smad mediated) and non-canonical (p38 MAPK mediated) BMP signalling pathways have been described to function in T cells<sup>(21,22)</sup>, an alternative explanation is that BMP2 and BMP4 could differentially trigger the Smad and non-Smad-dependent signalling pathways leading to distinct cell responses, as reported in other cellular systems<sup>(26,27)</sup>.

In summary, we show that the BMP pathway is functional in peripheral murine CD4<sup>+</sup> T cells. Furthermore, the expression of BMP receptors mainly in activated T cells and the BMP modulation of T cell proliferation suggest that BMP signalling is a physiological component of CD4<sup>+</sup> T cell responses.

## DISCLOSURES

The authors declare no financial conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BFU2006-00651 (Ministerio de Educación y Ciencia), RD06/0010/0003 (Instituto de Salud Carlos III), GR74/07-910552 (Universidad Complutense / Comunidad Autónoma de Madrid), and PR34/07-15867 (Universidad Complutense / Grupo Santander).

## CORRESPONDENCIA:

Angeles Vicente, PhD

Departamento de Biología Celular. Facultad de Medicina.

Universidad Complutense. 28040 Madrid, Spain

Phone: +34 91 3947166. Fax: +34 91 3941396

E-mail: avicente@bio.ucm.es

## REFERENCIAS

1. Kingsley DM. The TGF- $\beta$  superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133-146.
2. Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: A cocktail of modulators. *Dev Biol* 2002;250:231-250.
3. Gazzero E, Minetti C. Potential drug targets within bone morphogenetic protein signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:325-333.
4. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9:49-61.
5. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:251-263.
6. Zwijsen A, Verschueren K, Huylebroeck D. New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Lett* 2003;546:133-139.
7. Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF- $\beta$  superfamily signalling. *Genes Cells* 2002;7:1191-1204.
8. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF- $\beta$ /BMP and other pathways. *Cell Res* 2009; 19: 71-88.
9. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-899.
10. Chen D, Zhao M, Harris SE, Mi Z. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci* 2004; 9: 349-358.
11. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1139-1148.
12. Detmer K, Walker AN. Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. *Cytokine* 2002; 17: 36-42.
13. Grassinger J, Simon M, Mueller G, Drewel D, Andreesen R, Hennemann B. Bone morphogenetic protein (BMP)-7 but not BMP-2 and BMP-4 improves maintenance of primitive peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells (HPC) cultured in serum-free medium supplemented with early acting cytokines. *Cytokine* 2007; 40: 165-171.
14. Kersten C, Dosen G, Myklebust JH, Sivertsen EA, Hystad ME, Smeland EB, et al. BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis-upregulation of Id1 and Id3. *Exp Hematol* 2006; 34:72-81.
15. Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol* 2005; 6: 9.
16. Hjertner O, Hjorth-Hansen H, Borset M, Seidel C, Waage A, Sundan A. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood* 2001; 97: 516-522.
17. Ro TB, Holt RU, Brenne AT, Hjorth-Hansen H, Waage A, Hjertner O, et al. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene* 2004; 23:3024-3032.
18. Cejalvo T, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, Diez B, Gutierrez-Frías C, Valencia J, et al. Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. *Immunology* 2007; 121: 94-104.
19. Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merkenschlager M. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* 2002; 196: 163-171.
20. Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A, et al. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* 2002; 169: 5496-5504.

21. de la Pena LS, Billings PC, Fiori JL, Ahn J, Kaplan FS, Shore EM. Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), a disorder of ectopic osteogenesis, misregulates cell surface expression and trafficking of BMPRIA. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1168-1176.
22. Sivertsen EA, Huse K, Hystad ME, Kersten C, Smeland EB, Myklebust JH. Inhibitory effects and target genes of bone morphogenetic protein 6 in Jurkat TAg cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2937-2948.
23. Kretschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF- $\beta$  family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997; 11: 984-95.
24. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, et al. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 366-371.
25. Yokouchi Y, Sakiyama J, Kameda T, Iba H, Suzuki A, Ueno N, et al. BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* 1996; 122: 3725-3734.
26. Haynes T, Gutierrez C, Aycinena JC, Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K. BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 20380-20385.
27. Kendall SE, Battelli C, Irwin S, Mitchell JG, Glackin CA, Verdi JM. NRAGE mediates p38 activation and neural progenitor apoptosis via the bone morphogenetic protein signaling cascade. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 7711-7724.